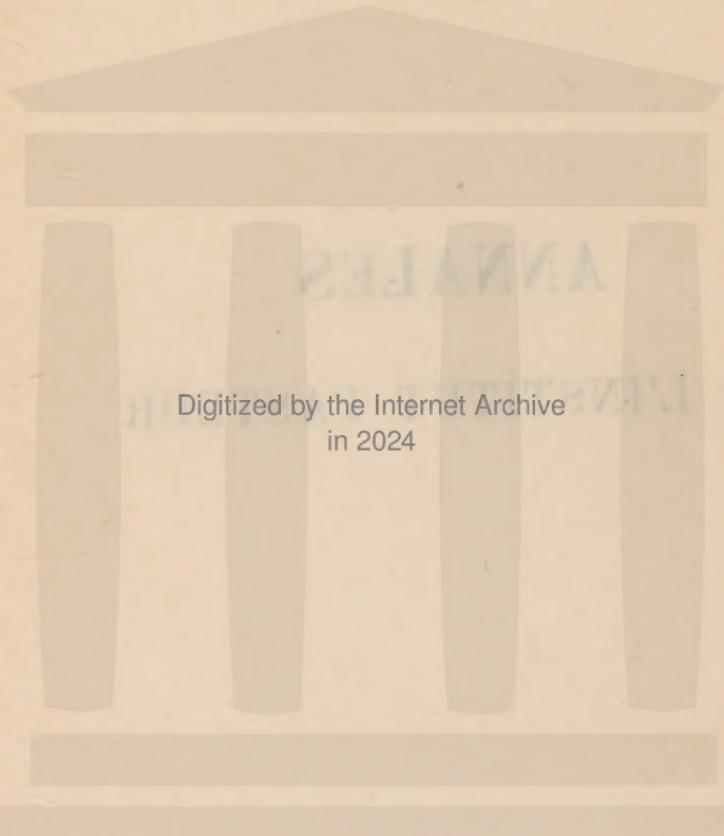


ANNALES  
DE L'INSTITUT PASTEUR



Digitized by the Internet Archive  
in 2024

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR

**E. DUCLAUX**

ET CONTINUÉES PAR

**E. ROUX (1904)**

**A. CALMETTE (1922)**

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, G. RAMON, J. TRÉFOUËL,**  
assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

*Secrétaire général : P. LÉPINE.*

---

TOME SOIXANTE-QUATORZIÈME

DR

Janvier-Décembre 1948

I

A475

v.74-75

1948

PER

PARIS

MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS  
LIBRAIRES DE L'ACADEMIE DE MÉDECINE  
120, Boulevard Saint-Germain (6<sup>e</sup>).

# ANNALES DE L'INSTITUT PYTHAGORE

REVUE QUOTIDIENNE DE PHILOSOPHIE ET DE LITTÉRATURE

É. DECLEUX

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 4, RUE CASSETTE. — 1948

ANNALES  
DE  
**L'INSTITUT PASTEUR**

**ACTION DE LA STREPTOMYCINE  
SUR L'INFECTION TUBERCULEUSE  
EN CULTURES DE TISSUS (\*)**

par GEORGES BARSKI.

(*Institut Pasteur. Service des Virus.*)

Dès l'apparition de la streptomycine, l'attention fut attirée sur le fait que le bacille tuberculeux est l'un des micro-organismes les plus sensibles à l'action de ce nouvel antibiotique [19, 4, 3]. La concentration bactériostatique de la streptomycine à l'égard du bacille de Koch est de l'ordre de 0,1 µg et peut atteindre 0,3-0,5 µg [20] par centimètre cube. Pour des quantités supérieures, cette action bactériostatique peut facilement devenir bactéricide [20]. L'importance de ces effets associée aux propriétés pharmacologiques qui rapprochent la streptomycine de la pénicilline, (rapidité de diffusion, assez bonne tolérance par l'animal), permettent d'atteindre et d'entretenir des concentrations hautement bactériostatiques dans l'organisme : 25 unités et plus par centimètre cube de sérum sanguin [16]. Ces propriétés ont permis d'espérer que la streptomycine aurait une action bactériostatique rapide sinon stérilisante *in vivo* chez les animaux tuberculinisés et en clinique chez les sujets atteints de différentes formes de tuberculose. On croyait pouvoir atteindre des résultats thérapeutiques spectaculaires, analogues à ceux qui ont été observés avec la pénicilline pour le traitement des infections dues aux germes pénicillino-sensibles.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 novembre 1947.

Cependant, après de très nombreux résultats expérimentaux et les observations cliniques dont nous disposons actuellement, on peut juger que de telles espérances ne se sont pas pleinement réalisées.

Il ne semble pas, cependant, que l'action de la streptomycine puisse donner à coup sûr une *stérilisation définitive et complète* de l'infection tuberculeuse.

Telle est la conclusion qu'il est possible de tirer des travaux et des observations publiés par de très nombreux auteurs que nous ne pouvons citer qu'en partie [5, 18, 17, 13, 9, 2].

La faible action de la streptomycine dans l'expérimentation animale ainsi qu'en clinique médicale est surtout frappante si on la confronte, d'une part avec le fait que *Mycobacérium tuberculosis* figure en tête des micro-organismes sensibles *in vitro* à la streptomycine [2] et, d'autre part, avec le fait que la concentration de ce produit dans les tissus des sujets et des animaux traités, dépasse largement la concentration bactériostatique et même bactéricide. Parmi les différentes explications de ce phénomène, celle qui est le plus souvent évoquée lie cette inefficacité à la formation rapide des souches du bacille de Koch résistantes à la streptomycine. En effet, cette résistance peut apparaître *in vitro* lorsque les bacilles restent pendant un temps assez prolongé (52-100 jours d'après Willistone et Youmans [24]) en présence des concentrations progressivement croissantes de l'antibiotique.

On a également observé des souches sensibles à la streptomycine (isolées chez les malades au début du traitement) devenir streptomycino-résistantes au cours d'un traitement prolongé [26, 27, 11].

Cette explication ne nous a pas paru suffisante. Il ne semble pas, en effet, que la résistance à la streptomycine puisse prendre naissance assez rapidement pour protéger à elle seule le bacille contre des concentrations élevées de l'antibiotique dès les premières heures ou les premières journées du traitement.

Pour admettre cette explication, il faudrait d'abord élucider et démontrer comment et dans quelles circonstances les bacilles tuberculeux arrivent à trouver dans les tissus de l'animal infecté un abri contre des concentrations létales de streptomycine ; abri qui leur permettrait une accoutumance progressive et probablement assez lente.

Il nous semblait possible d'apporter plus de lumière et de précision dans cette question en nous servant de cultures de tissus infectés avec le bacille tuberculeux. Il s'agissait pour nous de savoir dans quelle mesure était justifiée l'hypothèse que les bacilles situés à l'intérieur des tissus et des cellules vivantes ont un comportement particulier vis à vis de l'antibiotique.

La culture de tissus infectés par différentes souches de bacille de Koch ainsi qu'avec le BCG [14] a été réalisée il y

a déjà 20 ans, simultanément et indépendamment par Maximow [15], Timofejewski et Benewolenskaja [22] à l'aide de la technique de Carrel. Ces auteurs ont observé régulièrement l'apparition dans les cultures, dès les quatrième et cinquième jours, des images histologiques propres à la lésion tuberculeuse : tissus épithélioïdes, cellules géantes du type Langhans, qui accompagnaient la pénétration et le développement du bacille dans le tissu explanté.

### Partie expérimentale.

#### A. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Comme dans les expériences devenues classiques de Maximow, Timofejewski et Lang [12], nous nous sommes servi de tissus de lapins adultes et sains. Après avoir essayé différents tissus, nous avons choisi pour nos expériences, la rate et le poumon.

Les fragments de tissu, découpés en petits carrés ne dépassant pas 1 mm<sup>2</sup>, sont posés d'abord pendant vingt-quatre heures à la surface humide d'une goutte de plasma coagulé, ce qui permet de se débarrasser des globules rouges et des débris cellulaires. Après quoi on commence la culture proprement dite.

La stricte répétition des cultures de Maximow et Timofejewski nous a donné des résultats satisfaisants. Voulant cependant mettre en marche pour une période prolongée une quantité assez considérable de cultures, infectées et non infectées, traitées ou non traitées à la streptomycine, nous avons choisi une technique originale permettant l'exécution facile du lavage et du renouvellement de milieu en masse.

Cette méthode s'inspire en partie de la technique employée pour nos cultures de tissu épithéial sur membranes plastiques [25]. Plaçant sur de petites lames de verre des anneaux de verre et les fixant à l'aide de quelques gouttes de plasma coagulé, on obtient de petits alvéoles étanches au fond desquels on place des fragments de tissu à cultiver. On les recouvre ensuite du milieu plasmatique. En utilisant cette technique, les lavages répétés et renouvellement du milieu (opération très délicate avec les techniques classiques) deviennent très aisés, les risques d'infection étant minimes (1 à 2 p. c. d'infection). Les cultures, au nombre de six, sont placées sur une lame de verre carrée (11 × 11 cm.) et sont recouvertes avec un couvercle de boîte de Petri stérile. Le bord de la boîte de Petri est scellé à la paraffine. Les cultures sont ensuite placées à l'étuve à 37° C en position couchée.

Au début des cultures, on ajoute au milieu 50 cm<sup>3</sup> de pénicilline, de façon à éviter les infections accidentelles.

Comme milieu de culture, nous utilisons un mélange (en parties égales) 1<sup>o</sup> de plasma sanguin hépariné de lapin (1 : 75.000), 2<sup>o</sup> de l'extrait de rate, 3<sup>o</sup> de liquide de Tyrode modifié, dont le

glucose est supprimé pour éviter l'influence perturbatrice qu'il exerce sur l'action bactériostatique de la streptomycine [6, 23, 24].

En ajoutant au milieu plasmatique 0,005 p. 100 de rouge de phénol, (qui est absolument inoffensif à cette concentration aussi bien pour le tissu que pour le bacille), on rend possible l'évaluation de changements de pH.

Le pH du milieu étant, au début, égal à 7,8-8,0, baisse ensuite



FIG. 4. — Culture de huit jours de rate de lapin adulte infectée avec le bacille de Koch (BCG), sans streptomycine. Les bacilles se trouvent en quantité à l'intérieur ainsi qu'à l'extérieur des cellules. (Phot. A. Guichard, Institut Pasteur.)

faiblement jusqu'à 7,2 — 7,6, se trouvant toujours dans les limites de l'activité bactériostatique de la streptomycine [26] et descend au-dessous de 7,0 uniquement dans les cultures infectées ou desséchées. Ces cultures, impropre à l'étude de l'action de la streptomycine, sont éliminées.

Dans les expériences présentées ici, nous avons choisi, pour infecter les tissus, la souche BCG, car les lésions caractéristiques de l'inflammation tuberculeuse et la nécrose du tissu qu'elle pro-

voque apparaissent et se développent beaucoup plus lentement qu'avec les autres souches du bacille tuberculeux [18]. Il devenait ainsi possible d'observer, dans de meilleures conditions, le développement du processus tuberculeux dans le tissu et l'action qu'exerce la streptomycine sur l'infection.

La souche BCG est celle de l'Institut Pasteur. Les concentrations de streptomycine qui produisent un effet bactériostatique dans le milieu de Sauton, pour cette souche, sont de l'ordre de



FIG. 2. — Périphérie d'une culture de rate (lapin adulte) de neuf jours, infectée avec le bacille de Koch (BCG), sans streptomycine, fixée et colorée directement sur la lame de verre qui sert de support à la culture. Pullulation abondante des bacilles. Certains d'entre eux sont phagocytés. (Phot. A. Guichard, Institut Pasteur)

1 u/cm<sup>3</sup> d'après Bretey (1) et de l'ordre de 2 à 10 u/cm<sup>3</sup> d'après Boe et Vogelsang [1]. On infecte les fragments en les plongeant pendant une heure, dans une suspension légèrement opalescente de bacilles obtenus par broyage et une forte dilution d'une culture de douze-treize jours sur pomme de terre glycérinée. Avant la mise en culture, on lave les fragments 4 à 5 fois dans l'eau physiologique. Par cette méthode, l'infection des fragments de tissu a toujours été effective.

(1) Communication personnelle.

La streptomycine est incorporée dans le milieu plasmatique de façon à obtenir une concentration définitive de 50 ou 100 u/cm<sup>3</sup>, c'est-à-dire à des taux surpassant les concentrations obtenues dans les tissus chez l'animal ou chez l'homme [16]. La streptomycine employée (Merck, 1947) provenait du stock qui a servi pour les expériences exécutées à l'Institut Pasteur au Service de Chimie thérapeutique (M<sup>me</sup> Tréfouël). Ces expériences ont confirmé [8] son action bactériostatique *in vitro* sur les différentes souches du bacille tuberculeux.

L'examen microscopique des cultures est effectué tous les trois

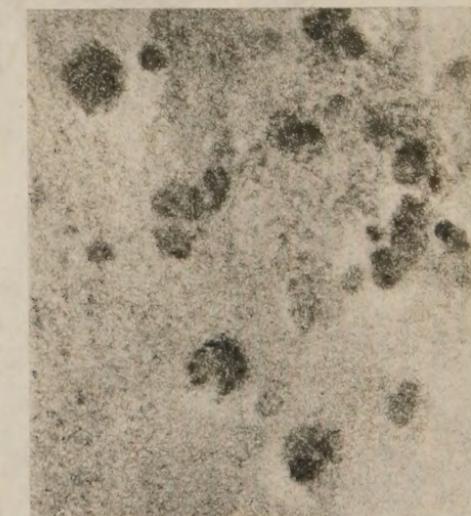


FIG. 3. — Périphérie d'une culture de rate (lapin adulte) de neuf jours, infectée avec le bacille de Koch (BCG), la streptomycine (50 unités par centimètre cube) étant ajoutée le quatrième jour. Les bacilles peu nombreux sont visibles seulement à l'intérieur des macrophages. (Phot. A. Guichard, Institut Pasteur.)

à quatre jours avec un faible grossissement, ce qui donne la possibilité d'observer les migrations cellulaires, le caractère général de croissance, ainsi que le développement de colonies de BCG. Pour l'étude précise des altérations histologiques ainsi que pour l'étude du développement du bacille, on prélève des fragments à différents stades de cultures. Ils sont ensuite fixés au Zenker-formol, puis coupés et colorés. On colore par la fuchsine de Ziehl (pendant une demi-heure après chauffage), décoloration par l'acide chlorhydrique à 1 p. 100 en alcool à 70° pendant trente à soixante secondes.

Après un lavage très minutieux, on sure colore pendant vingt-

vingt-cinq minutes avec le Giemsa (rapide). La coloration des bacilles et celle des cellules sont, par cette méthode, d'une grande netteté. Il est parfois possible de fixer et de colorer directement la zone du tissu néoformé sur la lame de verre qui sert de support à la culture.

#### B. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Nous donnons ici les résultats de 4 expériences exécutées après



FIG. 4. — Culture de poumon (lapin adulte) de quatorze jours, infectée avec le bacille de Koch (BCG.), soumise à l'action de la streptomycine (50 unités les premier, troisième et dixième jours). On retrouve les bacilles dans le protoplasma d'une cellule à plusieurs noyaux. (Phot. A Guichard, Institut Pasteur.)

la mise au point complète de la technique. Dans ces 4 essais, nous avons cultivé parallèlement :

- 1<sup>o</sup> Le tissu normal de la rate et du poumon de lapin;
- 2<sup>o</sup> Le même tissu infecté d'emblée avec le bacille de Koch (souche BCG) en milieu habituel;
- 3<sup>o</sup> Des fragments non infectés et cultivés en milieu contenant la streptomycine;
- 4<sup>o</sup> Et enfin des fragments de tissu infectés et soumis à l'action de la streptomycine, l'antibiotique étant présent le plus souvent dès le début de la culture.

La concentration en streptomycine était de 100 u/cm<sup>3</sup> pour une des séries (série IV) et de 50 u/cm<sup>3</sup> pour d'autres séries (séries II, V et VI).

Dans certains cas, la streptomycine ne fut pas ajoutée d'emblée, mais après un certain délai (quatre jours). Le renouvellement du milieu dans les cultures s'effectuait tous les quatre à



FIG. 5. — Culture de poumon (lapin adulte) de douze jours, infectée avec le bacille de Koch (BCG), soumise à l'action de la streptomycine (50 unités le premier et le sixième jour). On voit une cellule géante avec plusieurs noyaux et protoplasme basophile. (Phot. A. Guichard, Institut Pasteur.)

cinq jours (comme pour les cultures habituelles) par l'adjonction d'une nouvelle goutte de milieu contenant la streptomycine après un lavage d'une heure avec de l'eau physiologique contenant elle aussi de la streptomycine à la même concentration.

1<sup>o</sup> Les cultures normales (de la rate et du poumon) montrent dès le deuxième-troisième jour une migration cellulaire considérable suivie d'une croissance abondante des fibroblastes. La zone

de néo-croissance manifeste toujours une grande activité tandis que le tissu initial au milieu du fragment montre souvent une nécrose. On n'a pas observé de cellules géantes dans ces cultures.

2° Dans les cultures infectées avec le bacille de Koch, on constate souvent, en l'examinant directement au faible grossissement, une migration cellulaire moins importante, mais la croissance du tissu conjonctif (fibroblastes) est toujours visible. Après cinq à sept jours, on voit bien les colonies du bacille, parfois à distance du fragment de tissu, d'autres fois au contact même des fibroblastes en croissance. Sur les préparations colorées, les images histologiques sont très caractéristiques. Déjà, du troisième au cinquième jour on voit apparaître des agglomérations typiques du tissu épithélioïde et de très nombreuses cellules géantes du type Langhans avec plusieurs noyaux et un protoplasme basophile. Ces cellules ne contiennent qu'exceptionnellement des bacilles acidorésistants.

3° Dans les cultures non infectées soumises à l'action de la streptomycine, on ne constate aucune action de cette substance sur la croissance des tissus.

4° En présence de streptomycine, les cellules géantes apparaissent dans le tissu infecté, mais elles sont moins nombreuses que dans le tissu infecté et non soumis à l'action de l'antibiotique. Les huitième-dixième jours, le contraste est frappant entre le tissu infecté et traité par la streptomycine et le même tissu également infecté mais non soumis à son action. En présence de la streptomycine, les tissus sont généralement bien conservés et leur développement est normal, alors qu'en l'absence de la streptomycine, on ne voit souvent que de grosses cellules géantes et des fibroblastes au milieu d'un tissu nécrosé.

En présence de streptomycine, on ne constate pas de pullulation bacillaire à l'extérieur du fragment. Cette différence est très visible sur les préparations fig. 2 (sans streptomycine) et fig. 3 (50 unités/cm<sup>3</sup> de streptomycine ajoutées le quatrième jour). En général, on voit, en présence de streptomycine, beaucoup moins de bactéries, et celles-ci se trouvent seulement à l'intérieur de certaines cellules épithélioïdes ou des macrophages. Les bacilles inclus dans leur protoplasme restent acido-résistants, ils sont parfois granuleux.

Si, comme on a procédé dans la série N VI, on lave soigneusement pendant deux heures une culture, qui était antérieurement infectée par le BCG et était restée pendant douze jours en présence de streptomycine, on observe une reprise de croissance de bacilles à l'intérieur et à l'extérieur des cellules.

Pour compléter ces résultats, nous avons dans les séries V et VI exécuté parallèlement une congélation (dix-huit heures à -4°-5° C) de certaines cultures infectées par le BCG non traitées à la streptomycine.

Cette opération a provoqué la mort du tissu. Elle ne s'est pas cependant montrée nuisible pour les bacilles. Ce qui est en accord avec le fait bien connu et confirmé [7] de la résistance du bacille de Koch à l'abaissement de température.

Sur les préparations de ces cultures remises à l'étuve à 37° pendant huit jours après la congélation on constate la pullulation du bacille dans le tissu nérosé. Dans le témoin (également infecté et congelé) mis quatre jours après la congélation dans un milieu plasmatique contenant 50 unités de streptomycine par centimètre cube, on ne voit qu'un bacille sur 3 ou 4 préparations.

### Discussion.

De ces résultats expérimentaux remarquablement constants et concordants on peut conclure :

La streptomycine aux concentrations employées possède une action bactériostatique et très probablement aussi bactéricide sur le bacille de Koch (souche BCG) se trouvant en dehors des cellules du tissu vivant, dans le milieu plasmatique ou dans la zone nérosée de ce tissu. Cependant il semble que son action ne soit pas aussi complète à l'égard des bacilles qui se trouvent à l'intérieur des cellules vivantes. Incorporés dans le protoplasme cellulaire, ils ne sont pas seulement à l'abri de l'action de cet antibiotique mais aussi gardent leur pouvoir de multiplication. En effet, le groupement et le nombre des bacilles est ici très différent de l'image de quelques bacilles isolés et phagocytés qu'on voit dans les cultures fraîchement infectées.

La preuve de l'activité du bacille dans les cultures en présence de streptomycine est apportée aussi par l'apparition du tissu épithélioïde et des cellules géantes.

La vitalité des fragments tissulaires infectés et traités systématiquement avec la streptomycine se conserve pourtant mieux et plus longtemps.

Ces résultats s'accordent parfaitement avec tout ce que nous connaissons de la streptomycine dans la tuberculose expérimentale et clinique.

L'action des concentrations plus fortes de l'antibiotique, son action sur les tissus infectés par différentes souches du bacille de Koch, ainsi que l'influence simultanée de certains agents chimiques sont l'objet de travaux en cours.

### Conclusion.

1° On a obtenu à l'aide d'une technique spéciale des cultures de tissu de la rate et du poumon de lapin en présence du bacille tuberculeux (souche BCG). La durée de la culture a été de dix à

vingt jours et on a vu dans les fragments examinés les lésions histologiques propres de l'inflammation tuberculeuse : tissu épithélioïde et cellules géantes.

2<sup>o</sup> En ajoutant au milieu plasmatique la streptomycine (50 à 100 unités par centimètre cube) on arrête la pullulation du BCG en dehors du tissu vivant sans empêcher cependant sa survie et son développement intracellulaire.

3<sup>o</sup> Après congélation et mort du tissu, le bacille continue à se multiplier, si le milieu ne contient pas de streptomycine tandis qu'en présence de cet antibiotique, la pullulation du bacille est complètement supprimée.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOE (J.) et VOGELSONG (Th.). *Acta Tuberc. Scand.*, 1946, **20**, 158.
- [2] COMMITTEE ON CHEMOTHER. A. OTHERS AGENTS. *J. A. M. A.*, 1946, **132**, 70.
- [3] EMMART (E.). *Public Health Rep.*, 1945, **60**, 1415.
- [4] FELDMAN (W.) et HINSHAW (H.). *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1944, **59**, 593.
- [5] FELDMAN (W.), HINSHAW (H.) et MANN. *Am. Rev. Tub.*, 1945, **52**, 269.
- [6] GEIGER (W.), GREEN (S.) et WAKSMAN (S.). *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1946, **64**, 187.
- [7] GLOVER (R.). *J. Path. a. Bact.*, 1946, **58**, 3.
- [8] GRUMBACH (F.), MOUSSET (H.) et BOYER (F.). *Ces Annales*, 1947 (sous presse).
- [9] HINSHAW (H.) et FELDMAN (W.). *J. A. M. A.*, 1946, **132**, 778.
- [10] HOBBY (G.), LENNERT (D.) et HYMAN (B.). *J. Bact.*, 1946, **54**, 606.
- [11] KARLSON (A.) et WILLISTON (E.). *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1946, **63**, 131.
- [12] LANG (J.). *J. Infect. Dis.*, 1925, **37**, 430.
- [13] LEVADITI (C.) et VAISMAN (A.). *La Presse Méd.*, 1947, **54**, 611.
- [14] MAXIMOW (A.). *Ces Annales*, 1928, **42**, 224.
- [15] MAXIMOW (A.). *J. Infect. Dis.*, 1924, **34**, 549.
- [16] MOLITOR (H.). *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1947, **23**, 197.
- [17] ROCKWELL (G.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 607.
- [18] SMITH (D.), CLOSKY (Mc), JACKSON et BAUER. *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1946, **63**, 237.
- [19] SCHATZ et WAKSMAN (S.). *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1944, **57**, 244.
- [20] SMITH (D.) et WAKSMAN (S.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 47.
- [21] SYKES. *Nature*, 1946, **158**, 271.
- [22] TIMOFEEJEWSKI (A.) et BENEWOLENSKAJA (S. W.). *Virchows Arch.*, 1925, **255**, 613.
- [23] WAKSMAN et coll. *J. Bact.*, 1946, **51**, 634.
- [24] WILLISTONE (E.) et YOUNMANS (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 536.
- [25] WIRTH (J.) et BARSKI (G.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 987.
- [26] YOUNMANS (G.). *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1946, **21**, 126.
- [27] YOUNMANS (G.) et KARLSON (A.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 527.

# LA PENICILLINASE

## CONDITIONS DE PRODUCTION — ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ

par F. GRUMBACH, B. SUREAU et F. BOYER (\*).

Nous avons recherché les conditions les meilleures pour obtenir une pénicillinase active ; nous avons fait varier la nature du milieu de culture, son volume, sa surface libre, l'âge de la culture, le procédé de filtration ; et enfin, nous avons étudié les relations entre la concentration de l'enzyme et son activité. Toutes nos expériences ont été faites avec la souche de *B. subtilis* Ungar, que nous devons à l'amabilité du professeur L.-P. Garrod.

Les auteurs anglais donnent leur préférence à une méthode simple de préparation de pénicillinase active stérile, proposée par Ungar (1944) : ils se servent d'un filtrat de *B. subtilis* en eau peptonée : 1 cm<sup>3</sup> de filtrat obtenu neutralise environ 600 unités de pénicilline.

### I. — PRODUCTION.

Ainsi que nous l'avons indiqué dans une note précédente (1), pour la pratique courante nous ensemençons 0,5 cm<sup>3</sup> d'une culture de vingt-quatre heures de *B. subtilis* (S. Ungar) dans 250 cm<sup>3</sup> de bouillon ordinaire : après quatre jours d'étauve, la culture est neutralisée, centrifugée et filtrée. Nous obtenons couramment une pénicillinase capable d'inhiber 2.000 U. O. de pénicilline par goutte dans 5 cm<sup>3</sup> de milieu. Et nous avions déjà noté que l'intensité de l'action d'une même pénicillinase varie en fonction de divers facteurs que nous étudions dans ce travail.

1<sup>o</sup> INFLUENCE DE LA NATURE DU MILIEU. — Nous avons comparé la production de pénicillinase en bouillon ordinaire, avec et sans glucose.

Ainsi que le démontre le tableau ci-après, le bouillon ordinaire, additionné de glucose (2 p. 1.000), donne le meilleur rendement.

2<sup>o</sup> RÔLE DU VOLUME DU MILIEU DE CULTURE. — L'expérience montre que le rendement est d'autant meilleur que le milieu de culture a un volume plus restreint (fig. 1).

(1) Société Française de Microbiologie, séance du 6 novembre 1947.

(1) B. SUREAU et F. BOYER. Les substances « anti ». Leurs applications cliniques. Société Française de Microbiologie, juillet 1947.

TABLEAU I.

AGE DE LA CULTURE	BOUILLON ORDINAIRE	BOUILLON ORDINAIRE + GLUCOSE (2 p. 1000)
2 jours . . . . .	8.000 U.	5.000 U.
4 jours . . . . .	10.000 U.	12.000 U.
7 jours . . . . .	12.000 U.	18.000 U.
9 jours . . . . .	12.000 U.	20.000 U.

3<sup>o</sup> RÔLE DE LA SURFACE LIBRE DU MILIEU DE CULTURE. — Nous avons préparé plusieurs cultures de *B. subtilis* dans divers récipients présentant, pour un volume égal (200 cm<sup>3</sup> de milieu de culture), une surface libre variable : fioles Fournéau à petite sur-

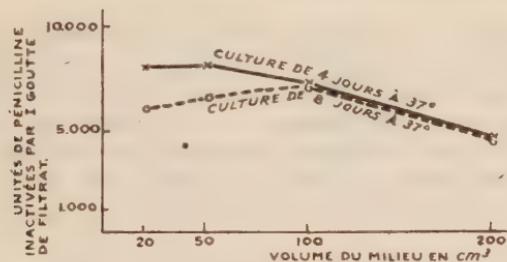


FIG. 1.

face et boîtes de Roux à grande surface. Le rendement est augmenté en fonction de la surface de la fiole. Pour deux cultures de même âge (quatre jours) on obtient en boîte de Roux un rendement double de celui obtenu en fiole Fournéau : par contre, le milieu en fiole Fournéau donne son optimum entre le huitième et le douzième jour, alors que le milieu en boîte de Roux a un rendement déjà diminué.

4<sup>o</sup> RENDEMENT EN FONCTION DE L'ÂGE DE LA CULTURE. — Du tableau ci-dessous il ressort que le rendement est optimum vers

TABLEAU II.

AGE DE LA CULTURE	UNITÉS DE PÉNICILLINE inactivées par 1 goutte de filtrat (Bougie L3)
24 heures . . . . .	40 U.
48 heures . . . . .	300 U.
3 jours . . . . .	5.000 U.
4 jours . . . . .	7.000 U.
5 jours . . . . .	9.000 U.
6 jours . . . . .	7.000 U.

Le cinquième jour de culture dans les conditions de l'expérience : culture de *B. subtilis* à 37°, en fioles de 50 cm<sup>3</sup>, sur bouillon ordinaire.

À delà de ce temps, le pouvoir enzymatique diminue.

5° INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE. — Nous avons essayé, dans des conditions comparables, des cultures à 23°, 28° et à 37°.

Au 4 <sup>e</sup> jour, 1 goutte de la culture à 23° inactive. . . . .	300 U.O.
Au 4 <sup>e</sup> jour, 1 goutte de la culture à 28° inactive. . . . .	4.000 U.O.
Au 4 <sup>e</sup> jour, 1 goutte de la culture à 37° inactive. . . . .	8.000 U.O.

Nous pensons que cela tient au fait qu'à 23° la culture est très discrète, tandis qu'à 37° elle est abondante ; la production de pénicillinase est en effet fonction de la richesse de la culture.

6° FILTRATION. — Nous avons comparé la filtration des cultures sur filtre Seitz et sur bougie L3. La bougie retient un faible pourcentage de pénicillinase, plus important que le filtre Seitz, mais nous lui donnons la préférence car elle assure une stérilisation plus parfaite que le filtre Seitz. On obtient un meilleur rendement en centrifugeant énergiquement la culture avant de la filtrer : la filtration sur bougie s'en trouve accélérée et n'entraîne pas de colmatage.

## II. — TITRAGE DE LA PÉNICILLINASE.

La plupart des auteurs qui se sont occupés de pénicillinase utilisent comme méthode de titrage la méthode des dilutions, dose fixe de pénicillinase et pénicilline en quantité croissante ; Ungar emploie 1 cm<sup>3</sup> de pénicillinase qui inactive environ 600 U. O. de pénicilline.

A partir d'une dose fixe de pénicillinase, 0,05 cm<sup>3</sup> (étant donné le titre élevé de nos filtrats), nous titrons son activité vis-à-vis de doses de pénicilline échelonnées de 1.000 U. O. à 20.000 U. O., dans 5 cm<sup>3</sup> de milieu de culture [peptone glucosée] (2).

Cette méthode nécessite des quantités considérables de pénicilline, en rapport avec le titre élevé de la pénicillinase ; nous verrons en effet que le fait de diluer les solutions de pénicillinase modifie beaucoup les résultats et rend leur interprétation difficile (3).

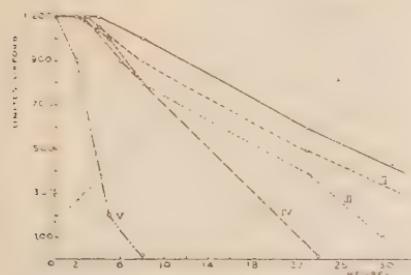
(2) La quantité de pénicillinase doit être mesurée très exactement, c'est pourquoi, abandonnant les pipettes compte-gouttes, nous n'employons que des pipettes graduées à 0,01 cm<sup>3</sup>. Cette précaution est indispensable pour éviter des variations considérables du titre d'une pénicillinase.

(3) F. GRUMBACH et F. BOYER. Méthodes de dosage de la pénicillinase. Société Française de Microbiologie, 6 novembre 1947.

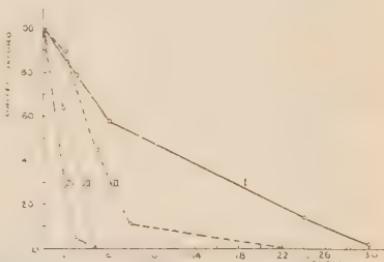
C'est pour parer à cet inconvénient que nous avons proposé une méthode de titrage en boîte de gélose, basée sur la diffusion de la pénicillinase dans la gélose (3). Cette méthode permet de titrer des pénicillinases non filtrées : les germes ne diffusent pas dans la gélose et les résultats trouvés sont identiques pour un même liquide, filtré ou non filtré.

### III. — INACTIVATION DE LA PÉNICILLINE PAR LA PÉNICILLINASE.

L'inhibition de la pénicilline par la pénicillinase demande un certain temps. Nous avons étudié la vitesse de cette réaction à 37° en dosant la pénicilline qui reste dans la solution (méthode Heatley) au bout de deux, quatre, six, huit, dix, douze, seize,



COURBES A.



COURBES B.

COURBES A. — 50.000 U. pénicilline dans 50 cm<sup>3</sup> de bouillon (1.000 U. par centimètre cube). I, + 1 goutte de pénicillinase; II, + II gouttes de pénicillinase; III, + V gouttes de pénicillinase; IV, + X gouttes de pénicillinase; V, + XX gouttes de pénicillinase.

COURBES B. — 5.000 U. pénicilline dans 50 cm<sup>3</sup> de bouillon (100 U. par centimètre cube). I, + 1 goutte de pénicillinase; II, + II gouttes de pénicillinase; III, + V gouttes de pénicillinase; IV, + X gouttes de pénicillinase.

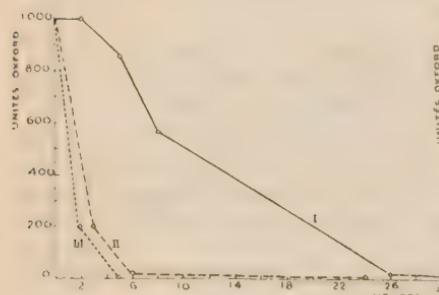
vingt-quatre, trente heures. Pour une même dose de pénicilline (50.000 U. O. dans 50 cm<sup>3</sup> de bouillon, soit 1.000 U. O. par centimètre cube), des doses variables de pénicillinase (I, II, V, X et XX gouttes) entraînent de grandes différences : avec XX gouttes de pénicillinase, la pénicilline est détruite en huit heures, tandis qu'avec I goutte, il reste encore 400 U. O. par centimètre cube de pénicilline non inactivée au bout de trente-deux heures (courbes A).

Avec une solution à 100 U. O. par centimètre cube de pénicilline dans le même volume que précédemment (50 cm<sup>3</sup>), les mêmes doses de pénicillinase inactivent beaucoup plus rapidement la pénicilline, et au bout de trente heures, I goutte de pénicillinase inactive totalement la solution de pénicilline (courbes B).

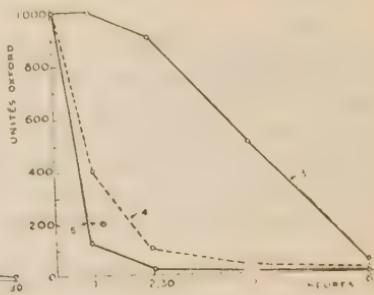
Par contre, à la concentration de 1.000 U. O. par centimètre cube dans un volume de 5 cm<sup>3</sup> de bouillon, la pénicilline est beaucoup plus rapidement inactivée par la pénicillinase ; elle est totalement détruite en cinq heures avec V gouttes de pénicillinase, presque totalement en six heures avec II gouttes et en vingt-six heures avec I goutte (courbes C).

Pour mieux suivre ce phénomène, nous avons étudié à l'électrobiophotomètre de Faguet, les courbes de croissance du staphylocoque (4) pendant vingt-quatre heures ; nous avons opéré comme suit :

On prépare 50 cm<sup>3</sup> de peptone glucosée dans chacune des six cuves que comporte l'appareil. Dans cinq de celles-ci on



COURBES C.



COURBES E.

COURBES C. — 5.000 U. pénicilline dans 5 cm<sup>3</sup> de bouillon (1.000 U. par centimètre cube) 1, + 1 goutte de pénicillinase; II, + II gouttes de pénicillinase; III, + V gouttes de pénicillinase.

COURBES E. — 50.000 U. pénicilline dans 50 cm<sup>3</sup> bouillon (1.000 U. par centimètre cube). 3, + 0,5 cm<sup>3</sup> pénicillinase; 4, + 2,5 cm<sup>3</sup> pénicillinase; 5, + 5 cm<sup>3</sup> pénicillinase; 6, + 10 cm<sup>3</sup> pénicillinase.

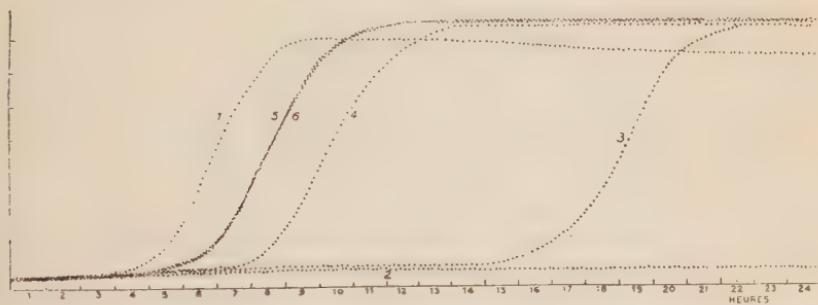
ajoute 50.000 U. O. de pénicilline (soit 1.000 U. O. par centimètre cube). La cuve n° 1 (ne contenant pas de pénicilline) sert de témoin de croissance normale du staphylocoque ; la cuve n° 2 est le témoin pénicilline sans pénicillinase. Les cuves 3, 4, 5 et 6 reçoivent respectivement 0,5, 2,5, 5 et 10 cm<sup>3</sup> de pénicillinase, puis on ensemence uniformément toutes les cuves avec une culture de vingt-quatre heures de staphylocoque (dilution finale 10<sup>-4</sup>). Les résultats sont enregistrés dans les courbes suivantes : (courbes D).

Pour la dose de pénicillinase la plus faible (0,5 cm<sup>3</sup>) [courbes 3],

(4) Nous remercions le Dr FAGUET qui a eu l'extrême obligeance de bien vouloir suivre l'enregistrement de ces courbes.

on constate un certain retard de la culture du staphylocoque qui finit par pousser normalement et rattraper la courbe témoin en vingt-deux heures. Avec  $2.5 \text{ cm}^3$  de pénicillinase (courbes 4), ce retard est très diminué et avec 5 et  $10 \text{ cm}^3$ , on ne constate plus qu'un léger retard par rapport au témoin (courbes 5 et 6), retard du vraisemblablement au temps nécessaire pour que l'inhibition de la pénicilline par la pénicillinase se fasse ; cette réaction est d'autant plus lente que la quantité de pénicillinase en présence est plus faible. D'autre part, avec 5 et  $10 \text{ cm}^3$  de pénicillinase, les deux courbes sont tout à fait superposables ; il y a, par conséquent, une dose limite d'activité qu'on ne peut pas dépasser.

Parallèlement à cette expérience, en employant les mêmes



COURBES D. — Enregistrement à l'électrobiophotomètre des courbes de croissance du staphylocoque en présence de pénicilline + doses croissantes de pénicillinase. (50.000 U. de pénicilline dans  $50 \text{ cm}^3$  de bouillon.) 1, croissance normale du staphylocoque; 2, témoin pénicilline sans pénicillinase; 3, 50.000 U pénicilline +  $0.5 \text{ cm}^3$  pénicillinase; 4, 50.000 U. pénicilline +  $2.5 \text{ cm}^3$  pénicilline; 5, 50.000 U. pénicilline +  $5 \text{ cm}^3$  pénicillinase; 6, 50.000 U. pénicilline +  $10 \text{ cm}^3$  pénicillinase.

quantités de milieu et les mêmes proportions de pénicilline et de pénicillinase, nous avons dosé par la méthode Heatley la pénicilline non inactivée après un séjour de une, deux, trois, cinq et huit heures à l'étuve à  $37^\circ$ . Nous avons obtenu des résultats comparables (courbes E).

#### CONCLUSION.

La production de pénicillinase dans le cas du *B. subtilis* *Unguiculatus* est liée en premier lieu aux conditions de culture de ce germe ; non seulement la nature du milieu, mais encore le volume de la culture et sa surface libre, son âge, la température ambiante interviennent. En particulier, l'abondance de la culture et l'importance du voile favorisent la production de pénicillinase.

D'autre part, nos résultats montrent que l'inhibition de la pénicilline par la pénicillinase ne suit pas les lois qui régissent une simple réaction chimique ; la pénicillinase se comporte réellement comme un enzyme.

# ANTICORPS FORMÉS CHEZ LE CHEVAL PAR INJECTION INTRAVEINEUSE ET INTRADERMIQUE D'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE

par M. FAURE, R. LAMY et M. J. COULON.

Heidelberger, Treffers et Freund [1] ont émis l'hypothèse que la voie d'introduction d'un antigène chez un animal pouvait déterminer le type des anticorps formés. En effet, l'injection sous-cutanée au cheval d'albumine de lapin [1], d'ovalbumine [2, 3], d'hémocyanine [4], des toxines diphtérique, tétanique, etc., produit des anticorps qui précipitent avec leur antigène selon le type « flocculation » ; dans ce cas, l'immun-précipité ne se forme que dans une zone étroite située de part et d'autre du point d'équivalence entre l'antigène et son anticorps. Par contre, l'injection intraveineuse de globulines de lapin précipitées par l'alun à un cheval [1] a donné naissance à un anticorps qui réagit avec son antigène selon la même modalité que les polyosides et les protéines pneumococciques avec le sérum des chevaux auxquels on a administré des pneumocoques par voie intraveineuse ; dans cette réaction du type « précipitation », il se forme un immun-précipité insoluble même lorsque l'anticorps se trouve en grand excès par rapport à l'antigène. Cependant, ces auteurs reconnaissent que ces expériences ne sont pas absolument concluantes étant donné qu'une même préparation antigénique n'a pas été injectée à des chevaux par la voie intraveineuse ou la voie sous-cutanée. C'est pourquoi, nous avons, dans ce travail, étudié les anticorps formés chez le cheval par injection intraveineuse et également intradermique d'anatoxine diphtérique que l'on administre classiquement par la voie sous-cutanée. Nous avons, en particulier, étudié la localisation dans le sérum de l'antitoxine produite afin de savoir si elle est contenue dans la fraction des pseudo-globulines comme dans le sérum antidiphétique thérapeutique classique, ou bien si elle se trouve liée à la fraction des euglobulines qui renferment les anticorps antipneumococciques obtenus par la voie intraveineuse chez le cheval.

Par ailleurs, de nombreux auteurs ont observé depuis longtemps que l'administration sous-cutanée de la toxine ou de l'anatoxine diphtérique au cheval conduit à la formation d'une quantité d'antitoxine diphtérique beaucoup plus élevée que l'administration intraveineuse. Il en est de même chez le lapin et chez le

cobaye et ce fait est généralement attribué à une élimination plus rapide de l'antigène lorsqu'on l'injecte par la voie intraveineuse. Pour ralentir cette élimination, on insolabilise l'anatoxine par divers procédés et en particulier en la précipitant par de l'alun (Glenny [5]) ce qui, en effet, augmente son pouvoir antigénique. Freund et Bonanto [6] ont même constaté que la voie intraveineuse devient, chez le lapin, plus efficace que la voie sous-cutanée avec ces préparations ; chez le cheval, par contre, l'injection intraveineuse de l'anatoxine précipitée par de l'alun n'a donné que de très médiocres résultats. Dans ce travail, nous avons tenté d'améliorer cette technique en diminuant encore la solubilité de l'anatoxine diphtérique par action de l'alun de chrome sur le précipité obtenu avec l'alun d'aluminium.

#### PRÉPARATION DES ANTIGÈNES.

Nous avons utilisé comme matière première l'anatoxine brute préparée par l'Institut Pasteur pour l'hyperimmunisation des chevaux antidiphtériques.

1<sup>o</sup> PURIFICATION DE L'ANATOXINE DESTINÉE AUX INJECTIONS INTRADERMIQUES. — Afin de pouvoir injecter le nombre désiré d'unités d'anatoxine sous un volume aussi réduit que possible, nous avons purifié l'anatoxine brute en combinant la méthode de Boivin [7] et celle de Pappenheimer [8]. Par ce procédé brièvement résumé ci-dessous, on obtient facilement à partir d'une anatoxine de titre moyen (30 à 35 unités par cm<sup>3</sup>) et avec un rendement de 50 p. 100, une solution d'anatoxine contenant environ 20.000 unités par cm<sup>3</sup> et ne renfermant plus que 50 p. 100 d'impuretés.

4 litres d'anatoxine refroidie à 0° sont amenés à pH 3,5 par addition d'un mélange à parties égales d'acide perchlorique 2 N et d'acide chlorhydrique 2 N (1). Le précipité séparé par une centrifugation rapide est dissous dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau par neutralisation avec du carbonate de sodium (pH 7,5). La solution est agitée pendant dix minutes avec 10 g. de charbon « R. P. ». La solution partiellement décolorée et les trois eaux de lavage du charbon (200 cm<sup>3</sup> au total) sont additionnées de 80 cm<sup>3</sup> de solution saturée de SO<sub>4</sub>Am<sub>2</sub>. Le précipité formé est éliminé et on ajoute à la solution mère 320 cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>Am<sub>2</sub> saturé. Ce précipi-

(1) Nous avons remplacé l'acide trichloracétique, qu'il était alors difficile de se procurer, par l'acide perchlorique étudié par Neuberg [9] comme agent de défällation protéique. La purification d'un grand nombre d'échantillons d'anatoxine diphtérique nous a montré que l'on obtenait des résultats identiques avec ces 2 acides. On peut également utiliser, par mesure d'économie, des mélanges composés de 1 volume d'acide trichloracétique ou d'acide perchlorique 2 N et de 2 volumes d'acide chlorhydrique 2 N sans modifier le rendement de la précipitation de l'anatoxine.

pité qui renferme l'anatoxine, est purifié à nouveau de la même façon avec du  $\text{SO}_4\text{Am}_2$  en utilisant des quantités de réactifs moitié des précédentes : eau, 100 cm<sup>3</sup> ;  $\text{SO}_4\text{Am}_2$  saturé, 40 puis 160 cm<sup>3</sup>. Afin d'éliminer la majeure partie du sulfate d'ammonium qui imprègne ce précipité, par deux fois, on le dissout dans 200 cm<sup>3</sup> d'eau et on précipite l'anatoxine à pH 3,5 par addition d'acide perchlorique. On dissout le précipité par neutralisation dans un petit volume d'eau. On détermine le titre de la solution, on la dilue de façon qu'elle contienne 18.000 unités d'anatoxine par centimètre cube et on ajoute 5 p. 1.000 de phénol.

**2<sup>o</sup> INSOLUBILISATION DE L'ANATOXINE DESTINÉE AUX INJECTIONS INTRAVEINEUSES.** — Pour augmenter l'insolubilité de l'anatoxine précipitée par l'alun d'aluminium, nous l'avons traitée par un deuxième agent de tanage plus puissant que le précédent : l'alun de chrome. Nous avons ainsi obtenu des préparations extrêmement peu solubles, non seulement dans le phosphate disodique M/15, mais encore dans le sérum sanguin et qui, cependant, avaient conservé leur activité antigénique *in vitro* (dosage des unités d'anatoxine par flocculation après dissolution du précipité dans le sel de seignette) et leur propriété antigénique *in vivo* (formation d'antitoxine chez le lapin, après injection intraveineuse, en quantité au moins égale à celle obtenue par administration d'anatoxine précipitée seulement par l'alun d'aluminium).

L'étude des facteurs intervenant dans l'insolubilisation de l'anatoxine : concentration des solutions d'alun, pH, temps de contact, température, nous a conduits à préparer comme suit le produit destiné à l'immunisation des chevaux par voie intraveineuse :

A 100 cm<sup>3</sup> d'une solution d'anatoxine purifiée seulement par précipitation par de l'acide perchlorique et diluée de façon qu'elle renferme 0,5 p. 100 de protéines, on ajoute 30 cm<sup>3</sup> d'une solution d'alun d'aluminium et de potassium à 1 p. 100 et on amène le pH à 5 par addition de soude. Le précipité, séparé par une centrifugation très rapide, est mis en suspension dans 100 cm<sup>3</sup> d'une solution à 0,1 p. 100 d'alun de chrome et de potassium préalablement additionnée de soude jusqu'à début de précipitation. Après deux heures de contact à + 4°, le précipité est séparé, lavé deux fois, puis mis en suspension dans de l'eau physiologique. On détermine le titre de la suspension en dissolvant une partie aliquote du précipité à 37° dans du sel de seignette à 10 p. 100 dont on maintient la neutralité par addition de phosphate disodique ; on amène ce titre par dilution à 900 unités d'anatoxine par centimètre cube et on ajoute 1 p. 10.000 de merthiolate.

#### IMMUNISATION DES CHEVAUX.

Quelle que soit la forme de l'anatoxine administrée et la voie d'injection utilisée, tous les chevaux ont reçu le même nombre d'unités d'anatoxine selon la même cadence.

« Première immunisation » : 6 injections de 800, 2.400, 4.800, 10.000, 14.000 et 18.000 unités d'anatoxine en un mois. Saignées : dix et quatorze jours après la dernière injection.

Recharge : après deux semaines de repos, 3 injections de 8.000, 12.000 et 16.000 unités.

L'injection intradermique de l'anatoxine purifiée a provoqué une forte élévation thermique et la formation d'escarre locale ; l'injection intraveineuse de l'anatoxine insolubilisée par les aluns d'aluminium et de chrome n'a été suivie d'aucun choc. Dans les deux cas, l'état général des chevaux est resté excellent.

#### FRACTIONNEMENT DES SÉRUMS.

a) PAR DIALYSE. — On sépare les euglobulines en dialysant le sérum dans un sac de collodion vis-à-vis d'eau distillée à + 4° pendant plusieurs jours.

b) PAR LE SULFATE D'AMMONIUM. — Après dilution du sérum avec 2 volumes d'eau physiologique, on ajoute une solution saturée de  $\text{SO}_4\text{Am}_2$  de façon à obtenir d'abord la fraction précipitant à 33 p. 100 de saturation : globulines « 33 », puis la fraction précipitant à 55 p. 100 de saturation : globulines « 33-55 ». Les globulines « 33 » renferment principalement les globulines  $\gamma$  et les globulines « 33-55 » contiennent surtout les globulines  $\alpha$  et  $\beta$  selon la définition des fractions sériques obtenues par électrophorèse.

Les solutions de ces diverses fractions sont amenées à un volume égal à celui du sérum dont elles proviennent et leur activité antitoxique est déterminée à l'aide de la réaction de flocculation de Ramon. Les titres sont exprimés en unités floeulantes par  $\text{cm}^3$ .

#### RÉSULTATS.

Les titres des sérumis des 7 chevaux ayant reçu des injections intraveineuses d'anatoxine insolubilisée par les aluns d'aluminium et de chrome sont insérés dans le tableau I. L'activité antitoxique de ces sérumis (moyenne : 63 unités par  $\text{cm}^3$ ) est très faible par rapport à celle des sérumis préparés classiquement par l'injection sous-cutanée d'anatoxine : 150 à 1.500 unités par  $\text{cm}^3$ . Comme la capacité de production d'anatoxine varie considérablement d'un cheval à un autre, nous avons vérifié que les titres très bas obtenus dans cette expérience n'étaient pas dus uniquement au choix des chevaux, en soumettant ces derniers à deux autres immunisations par la voie sous-cutanée : pour la deuxième immunisation, nous avons utilisé de l'anatoxine insolubilisée par les aluns et pour la troisième immunisation, de l'anatoxine purifiée en solution. On voit (tableau I) que les titres antitoxiques, bien

TABLEAU I. — Titre antitoxique des sérum des chevaux soumis à une immunisation par voie intradermique avec de l'anatoxine insolubilisée par les aluns d'aluminium et de chrome puis à deux immunisations par voie sous-cutanée avec de l'anatoxine insoluble et de l'anatoxine soluble.

NUMÉROS des chevaux	VOIE D'INJECTION ET FORME DE L'ANATOXINE		
	Intraveineuse Anatoxine insoluble	Sous-cutanée Anatoxine insoluble	Sous-cutanée Anatoxine soluble
1. . . . .	70	140	150
2. . . . .	85	140	200
3. . . . .	65	150	150
4. . . . .	70	220	200
5. . . . .	50	55	300
6. . . . .	50	250	250
7. . . . .	50	100	200
Moyenne. . . . .	63	150	207

que faibles : moyennes 150 puis 200 unités (2), sont cependant nettement supérieurs à ceux obtenus après l'immunisation par voie intraveineuse. Par ailleurs, on ne peut pas attribuer la faible efficacité des injections intraveineuses de l'anatoxine insoluble à une formation plus lente des anticorps, car le cheval n° 7 a été soumis à deux immunisations intraveineuses successives et le titre de son sérum s'est maintenu à 50 unités. On voit donc que, en dépit de l'utilisation d'une anatoxine rendue particulièrement insoluble, la voie intraveineuse est demeurée chez le cheval moins efficace que la voie sous-cutanée, à l'inverse de ce qui a été observé chez le lapin.

Les 6 chevaux soumis à l'immunisation par voie intradermique avec une solution d'anatoxine purifiée ont donné les titres antitoxiques suivants : 625, 550, 225, 450 et 600. La moyenne des titres, 500 unités par centimètre cube, est égale à la moyenne des titres des chevaux immunisés à cette époque par la voie classique sous-cutanée. Ces chevaux ont reçu 4 « recharges » successives sous la forme également d'injections intradermiques d'anatoxine purifiée. Les titres de leur sérum ont baissé progressivement (titres moyens : 490, 410, 310, 270), mais d'une manière analogue à celle

(2) Les chevaux utilisés dans cette expérience se sont donc révélés de très mauvais producteurs d'antitoxine ; c'est pourquoi, il ne nous est pas possible de conclure que notre préparation d'anatoxine insolubilisée par l'action successive des aluns d'aluminium puis de chrome possède, chez le cheval, une valeur antigénique supérieure ou non à l'anatoxine précipitée seulement par l'alun d'aluminium utilisée par Freund et Bonanto.

que l'on observe lors de l'immunisation et des « recharges » effectuées par la technique classique. On voit donc que le cheval réagit de façon identique aux injections sous-cutanées et intradermiques d'anatoxine diphtérique.

Dans le tableau II, nous donnons le résultat des fractionnements

TABLEAU II. — **Titre antitoxique des diverses fractions des sérum antidiplhtériques préparés par voies intraveineuse, intradermique ou sous-cutanée.**

Soluile	Soluile.	Insoluble.	FORME DE L'ANATOXINE	VOIE D'INJECTION	NUMÉROS DES CHEVAUX	SERUM TOTAL	FRACTIONNEMENT EFFECTUÉ		
							par dialyse	avec $\text{SO}_4\text{Am}_2$	
Sous-cutanée.	Intradermique.	Intraveineuse.							
					70	70	70	70	70
					85	80	80	80	80
					65	60	60	60	60
					70	45	45	45	45
					50	45	45	45	45
					50	45	45	45	45
					Moyenne .	63	57,5	49	31
					8	470 (1)	445	425	300
					9	480	480	60	400
					10	425	425	45	90
					11	520	470	60	335
					12	480	420	120	335
					13	370	370	45	300
					Moyenne .	440	385	70	293
					14	200	235	40	200
					15	450	400	40	325
					16	425	400	40	355
					17	465	465	100	355
					18	270	260	30	230
					19	385	355	35	355
					Moyenne .	373	370	47,5	303

(1). Ces sérum ont été prélevés à la suite de la deuxième recharge. Les fractionnements effectués avec les sérum de ces mêmes chevaux à d'autres périodes de l'immunisation ont donné des résultats analogues.

des sérum des chevaux préparés par les diverses voies : intrader-

veineuse, intradermique et sous-cutanée. On voit que la répartition des anticorps dans les diverses fractions des sérum est pratiquement la même, quel que soit le mode de préparation de l'antitoxine. Dans tous les cas, les euglobulines n'entraînent qu'une partie faible ou nulle de l'activité antitoxique. Les globulines « 33 » renferment, le plus souvent, beaucoup moins d'antitoxine que les globulines « 33-55 », mais les proportions relatives sont très variables d'un sérum à un autre, ce qui ne permet pas d'attribuer une signification bien précise aux chiffres moyens calculés. Dans le cas des sérum préparés par voie intraveineuse, la proportion d'antitoxine contenue dans les globulines « 33 » est relativement élevée (2/3), mais la quantité absolue d'antitoxine reste faible. Par ailleurs, après l'immunisation suivante subie par ces chevaux et effectuée par la voie sous-cutanée, on a constaté une augmentation sensiblement parallèle de l'activité antitoxique dans les globulines « 33 » et « 33-55 ».

Lors des titrages de tous ces sérum ou de leurs produits de fractionnement, la combinaison de la toxine avec l'antitoxine s'est effectuée dans tous les cas selon le type « flocculation ». Ce fait se trouve en accord avec les résultats précédents qui ne nous ont pas montré de différence dans la nature des antitoxines formées.

EN RÉSUMÉ : 1° Contrairement à l'hypothèse émise par Heidelberger, Treffers et Freund, la voie d'injection d'un antigène n'a pas toujours une influence sur le type de l'anticorps formé. Dans le cas de l'anatoxine diphtérique et du cheval, que les injections soient faites par la voie sous-cutanée, intraveineuse ou intradermique, l'antitoxine formée est toujours localisée dans les mêmes fractions du sérum et elle réagit dans tous les cas, avec la toxine selon le type des réactions de flocculation.

2° L'injection intraveineuse au cheval de l'anatoxine diphtérique insolubilisée par l'action de l'alun d'aluminium puis de l'alun de chrome n'engendre qu'une faible quantité d'antitoxine : moins de 100 unités par centimètre cube.

3° L'anatoxine diphtérique purifiée injectée par voie intradermique au cheval donne des sérum antidiptériques possédant la même activité que les sérum obtenus par l'injection sous-cutanée d'anatoxine brute.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] HEIDELBERGER, TREFFERS et FREUND. *Federation Proc.*, 1942, **1**, 178.
- [2] PAPPENHEIMER. *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 263.
- [3] HEIDELBERGER, TREFFERS et MAYER. *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 271.
- [4] HOOKES et BOYD. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1942, **93**, 107. D'après Treffers, *Advance in protein chemistry*, 1944, **1**, 103.

- [5] GLENNY, BUTTLE et STEVENS. *J. Path. a. Bact.*, 1931, **34**, 267.
- [6] FREUND et BONANTO. *J. Immunol.*, 1941, **40**, 437.
- [7] BOIVIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 218.
- [8] PAPPENHEIMER. *J. Biol. Chem.*, 1947, **120**, 543.
- [9] NEUBERG, STRAUSS et LIPKIN. *Arch. Biochem.*, 1944, 101.

## SUR LE MÉCANISME DE LA RÉACTION DU CHOLÉRA-ROTH

par JEAN GALLUT (\*).

(*Institut Pasteur, Laboratoire des Instituts Pasteur coloniaux.*)

On sait qu'un caractère biochimique essentiel du vibron cholérique est fourni par son action simultanée sur les nitrates, qu'il transforme en nitrites, et sur les peptones aux dépens desquelles il produit de l'indol.

L'addition d'un acide minéral fort (par exemple  $0,5 \text{ cm}^3$  de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentré pour  $10 \text{ cm}^3$  du milieu) à une culture de vibron en eau peptonée, met en évidence cette double action par formation d'acide nitreux et secondairement de nitroso-indol coloré en rouge plus ou moins violacé : c'est la réaction du *choléra-roth* (C.-R.) [Poehl, 1886].

Cette réaction est donnée par tous les vibrions cholériques ; quoique non spécifique, elle apporte néanmoins au diagnostic bactériologique du choléra un élément de présomption indispensable ; son intérêt demeure donc toujours actuel.

Le processus du C.-R., c'est-à-dire la production simultanée des nitrites et de l'indol, sans doute parce qu'il paraissait simple, n'avait pas, jusqu'à ces dernières années, suscité d'étude particulière. Cependant, tout récemment, des auteurs indiens : Sudhindra Nath Sen, Phanindra Nath Basu et Diptis Chandra Chakraborty [1, 2], dans deux notes successives, ont publié une étude sur la biochimie de la réaction du C.-R. dont certains points nous ont paru être, par leur interprétation, en discordance avec quelques observations de nos derniers travaux sur le potentiel d'oxydo-réduction du vibron cholérique [3] d'une part, et sur l'utilisation du glucose par le vibron cholérique en aération forcée [4] d'autre part.

C'est pourquoi le présent travail a été entrepris dans le but de déterminer d'abord le mécanisme d'apparition du C.-R. dans les différentes conditions de culture et secondairement de préciser le rôle inhibiteur du glucose.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 novembre 1947.

\*  
\* \*

Pour effectuer correctement la réaction du C.-R., il est classique de prescrire l'observation des trois points suivants : absence d'indol dans les peptones utilisées, temps de culture suffisant et absence de glucose dans le milieu.

Si la première condition est évidente, on s'accorde souvent pour la deuxième sur un temps d'incubation de quarante-huit heures à 37°, qui nous a semblé généralement excessif ; quant à la troisième condition, si l'addition de glucose à l'eau peptonée avant la culture se traduit presque toujours par un défaut de la réaction du C.-R., le mécanisme de cette inhibition, quoique simple, est encore discuté à l'heure actuelle.

\*  
\* \*

La réaction du C.-R. dépendant de la présence simultanée des nitrites et de l'indol, il convenait d'étudier séparément les conditions (horaire pH et rH) de l'apparition de ces deux facteurs.

Nous avons donc dosé séparément les nitrites et l'indol dans les milieux soumis aux différents modes de cultures qui pouvaient être envisagés : c'est-à-dire l'eau peptonée simple ou glucosée à des taux variables, soit en culture normale dite *aérobiose* (1), soit en anaérobiose, soit en aération forcée.

Secondeairement, et dans le but de contrôler nos résultats avec plus de précision, nous avons utilisé aussi un milieu synthétique spécial.

**TECHNIQUE.** — Le milieu utilisé (peptone Uclaf 30, NaCl 5 p. 1.000 ajusté à pH 8) est extrêmement favorable à la production d'indol, car la peptone choisie est très riche en acides aminés dont le tryptophane.

Le vibron cholérique authentique, souche Hanoï VII du type Inaba, a été choisi parmi les plus indologènes de notre collection.

Tous les dosages ont été faits par colorimétrie au moyen du photocolorimètre absolu de Bonét-Maury [5].

Pour le dosage des nitrites nous avons employé le réactif de Griess (acide rosanilique et *a* naphylamine). Cette réaction très sensible se traduit par une coloration rouge très stable qu'il est facile de comparer à une gamme étalon de nitrite de sodium. La lumière utilisée était filtrée par un écran vert Wratten 61 et de  $\lambda$  maxima 520.

Le chiffre des nitrites a été exprimé arbitrairement en nitrite de sodium.

Pour le dosage de l'indol, par contre, il n'est pas possible de com-

(1) Un précédent travail [3] nous a montré que les cultures du *V. cholérique* dites aérobies présentent en réalité une phase d'anaérobiose spontanée très marquée.

parer simplement la teinte du C.-R. avec une gamme étalon de nitroso-indol (obtenue au moyen d'un mélange de quantités connues de nitrite de sodium et d'indol pur) car cette teinte dépend essentiellement de la proportion relative des deux éléments qui varient indépendamment dans la culture. Nous avons pu constater en effet que pour un rapport  $\frac{\text{indol}}{\text{nitrites}}$  inférieur ou égal à 1, le C.-R. se traduisait par une

coloration rouge franc, tandis que pour un rapport  $\frac{\text{indol}}{\text{nitrites}}$  supérieur à 2, la coloration était violet pur. Il est par suite impossible d'utiliser une lumière monochromatique convenant à cette réaction.

Le dosage de l'indol a donc été effectué, avec des résultats concordants, soit par la technique de Happold et Hoyle [6] (extraction à l'éther de pétrole et emploi du réactif d'Erlich au paradiphénylaminobenzaldéhyde), soit plus commodément par la réaction du nitro-prussiate de sodium (en milieu aqueux alcalinisé ensuite par la soude puis neutralisé par l'acide acétique) qui donne une teinte bleue suffisamment stable et qui permet de doser 1 γ d'indol dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée. Les mesures ont été faites dans cette dernière technique sous écran rouge Wratten 27 ( $\lambda$  maxima 650).

Le dosage des nitrates a été fait par le procédé de Grandval et Lajoux : le glucose a été dosé par la méthode de Folin et Wu [7].

### I. — MÉCANISME DU C.-R. EN « VÉROBIOSE ».

1<sup>o</sup> CULTURE EN EAU PEPTONÉE SIMPLE (fig. 1). — a) *Nitrites*. — L'eau peptonée stérile utilisée contenait environ 45 mg. par litre de nitrates et des traces de nitrites (moins de 1 mg. par litre) ; après l'ensemencement et la mise à l'étuve à 37°, cette teneur reste inchangée pendant trois heures, puis il se produit une augmentation brusque des nitrites vers la quatrième heure (en même temps le  $E_{\text{H}}$  devient négatif), jusqu'au taux moyen de 20 à 25 mg. par litre, qui est atteint vers la sixième heure. Il n'y a pratiquement plus de variation du taux des nitrites pendant sept jours. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hirsch [8] qui a montré que les nitrites n'étaient pas utilisés par le vibron cholérique cultivé en eau peptonée normale.

b) *Indol*. — On ne décèle pas d'indol dans les quatre premières heures ; vers la cinquième on peut en doser de petites quantités : environ 2 mg. par litre ; puis une augmentation régulière assez rapide en amène la teneur vers 30 mg. en vingt-quatre heures, 40 mg. en quarante heures. Le maximum est atteint vers la soixante-douzième heure : il est de l'ordre de 45 à 50 mg. par litre.

L'indol se maintient à ce taux sans grandes variations pendant sept jours pour ne décroître ensuite que très lentement.

En somme, dans ces conditions, qui sont celles de la recherche classique du C.-R., les chiffres ci-dessus et les courbes

de la figure 1 montrent que la production des nitrites est précoce : son maximum s'établit avant même le maximum de réduction enregistré dans la culture ( $E_h = -280$  mv. vers la seizeième heure) [3]. D'autre part, la production de l'indol est plus tardive et plus lente à s'établir ; elle paraît indépendante du potentiel d'oxydo-réduction ; en effet, si elle débute dans la période de réduction croissante, sa production se poursuit très régulièrement pendant le maximum de réduction et de même pendant la réoxydation progressive de la culture.

Quant au C.-R. proprement dit, il est difficile de préciser l'horaire de son apparition, car il faudrait pour cela convenir d'un seuil de densité optique dans une lumière mono-chromatique.

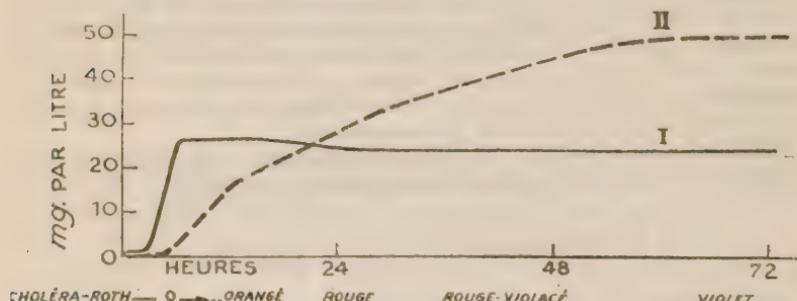


FIG. 1. — C. R. en eau peptonée simple en aérobiose.  
Courbe I, nitrites; courbe II, Indol.

tique bien définie ; or, comme nous l'avons dit plus haut, si l'on considère seulement une teinte *rouge orangé*, elle est appréciable à l'œil nu, déjà à la huitième heure, dans les conditions de nos expériences (environ 10 mg. d'indol par 20 mg. de nitrites par litre). Par contre la teinte *rouge violacé* (dite classiquement « Sollérino ») n'est visible qu'après vingt-quatre heures pour un taux équivalent de l'indol et des nitrites, soit 20 mg. par litre. Enfin, la teinte *violet pur* prédomine après quarante-huit heures lorsque le taux de l'indol atteint des valeurs au moins doubles de celui des nitrites.

**2<sup>o</sup> CULTURE EN EAU PEPTONÉE GLUCOSÉE.** (fig. 2). — Les expériences ont été faites à des taux de glucose variant de 1,5 à 15 p. 1.000.

a) *Nitrites*. — Quel que soit le taux de glucose, la production des nitrites se fait dans le même horaire qu'en eau peptonée simple : elle débute vers la quatrième heure et atteint un maximum de 20-25 mg. à la sixième heure. La courbe des nitrites en fonction

du temps (fig. 2) présente donc un plateau horizontal ou en décroissance peu sensible après quarante-huit heures.

Ces résultats indépendants de la teneur en glucose confirment ceux donnés par l'étude du potentiel d'oxydoréduction qui montre [3] que les variations du  $E_{\text{h}}$  en milieux glucosés ou non sont en effet du même ordre au début de la culture.

b) *Indol*. — Les résultats diffèrent ici suivant le taux du glucose. Lorsque celui-ci n'excède pas 1,5 p. 1.000, il est consommé en moins de cinq heures ; l'acidité de fermentation modérée n'abaisse pas le pH au-dessous de 7,5, les vibrios attaquent alors les peptones et la production d'indol, quoique retardée, est décelable néanmoins à partir de la huitième heure. Toutefois, elle est plus

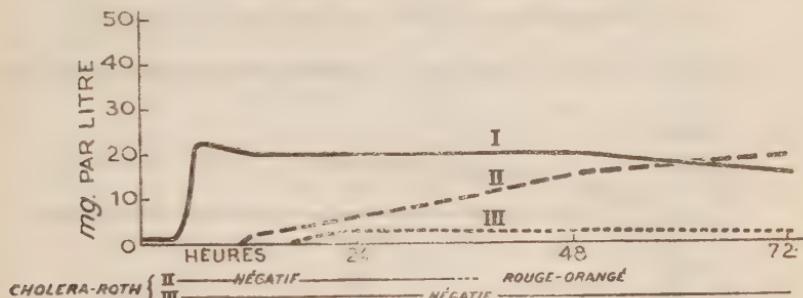


FIG. 2. — C. R. en eau peptonée glucosée en aérobiose. Courbe I, nitrites; courbe II, indol (glucose 1,5 p. 1.000); courbe III, indol (glucose 3 p. 1.000).

modérée que dans les milieux non glucosés et, bien qu'augmentant régulièrement, elle ne dépasse guère 20 mg. à la soixantième heure.

Pour un taux de glucose de l'ordre de 3 p. 1.000, dont la consommation demande huit heures, l'acidité de fermentation abaisse le pH jusqu'à 6,4 : un grand nombre de vibrios meurt et ceux qui survivent défavorisés par la réaction acide n'attaquent les peptones que bien faiblement. On ne décèle l'indol qu'après vingt-quatre heures et en quantité minimale (3 mg. par litre environ).

Enfin, pour des taux de glucose dépassant 7,5 p. 1.000, le sucre ne peut être consommé en totalité, l'acidité de fermentation abaisse rapidement le pH à 5,8, degré mortel pour le vibron. La culture s'arrête alors avant l'attaque des peptones et on n'y décèle jamais d'indol.

Ainsi en eau peptonée glucosée en aérobiose la réaction du C.-R. est commandée uniquement par la production de l'indol, puisque les nitrites y apparaissent, dans les mêmes conditions de temps et même quantité qu'en eau peptonée simple.

D'autre part, ces expériences confirment le fait déjà établi par

Hirsch [9], que le vibron cholérique consomme toujours les glucides de préférence aux protides, et que par conséquent l'attaque des peptones et la production d'indol consécutive ne peuvent avoir lieu qu'après épuisement du glucose ; avec cette circonstance aggravante qu'une trop grande teneur en sucre engendrant une acidité mortelle pour le vibron, l'attaque des peptones ne peut pratiquement pas avoir lieu pour un taux de glucose supérieur à 3 p. 1.000.

Dans les conditions de nos expériences, la réaction du C.-R. ne se manifestera donc avec une teinte rouge solférino d'intensité moyenne qu'aux environs de la soixantième heure pour une dose initiale de glucose de l'ordre de 1,5 p. 1.000.

## II. — MÉCANISME DU C.-R. EN ANAÉROBIOSE (fig. 3).

Les cultures ont été faites dans le même milieu qu'en aérobiose

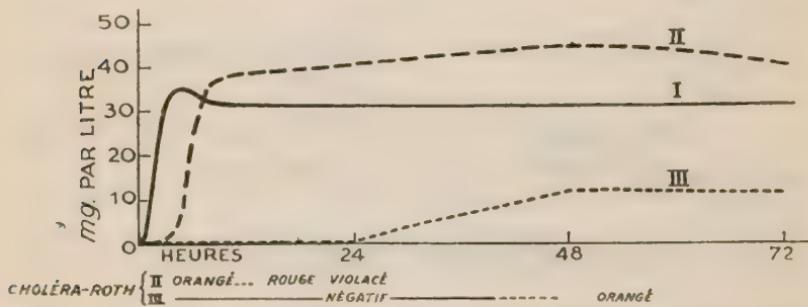


FIG. 3. — C. R. en eau peptonée simple et glucosée en anaérobiose. Courbe I, nitrites; courbe II, indol (sans glucose); courbe III, indol (glucose 1,5 p. 1.000).

mais maintenu sous une couche d'huile de vaseline après régénération. Ce milieu présente alors un  $E_h$  initial moyen de -50 mv (rH = 14) que la culture abaisse rapidement vers -250 mv (rH = 6) et maintient à ce potentiel pendant plusieurs jours.

1° EAU PEPTONÉE SIMPLE. — a) Le taux des *nitrites* s'élève plus rapidement en anaérobiose qu'en culture normale ; il atteint 20 à 30 mg. en deux heures et un maximum de 30 à 35 mg. par litre en quatre heures, qui ne varie plus sensiblement par la suite.

b) La production de l'*indol* est également plus brusque en anaérobiose qu'en culture normale : décelable en petites quantités dès la quatrième heure (3 mg.), il atteint en huit heures 35 mg. pour n'augmenter ensuite qu'insensiblement (45 mg. par litre en quarante-huit heures).

La réaction du C.-R. est donc praticable sur les cultures anaé-

robies, mais le fait que les nitrites sont produits à un taux relativement élevé alors que l'indol ne l'est qu'à un taux à peine supérieur, ne permet pas d'obtenir la teinte rouge violacé caractéristique. On n'observera donc qu'une coloration rouge orangé qui pourra même passer inaperçue dans les milieux trop foncés par certaines peptones.

**2<sup>o</sup> EAU PEPTONÉE GLUCOSÉE.** — *a)* Quel que soit le taux du glucose, la production des *nitrites* suit les mêmes variations qu'en eau peptonée simple anaérobiose.

*b)* La production de l'*indol*, par contre, de même qu'en aérobiose, dépend de la quantité de glucose que peut consommer le vibrion sans produire une acidité mortelle. Ce taux, ici aussi, ne dépasse guère 1,5 p. 1.000 ; mais le développement du vibrion cholérique étant relativement moindre en anaérobiose qu'en aérobiose, la consommation totale du glucose demande sept à huit heures au lieu de cinq heures et l'horaire de production de l'*indol* s'en trouve quelque peu retardé. Ce n'est qu'après vingt-quatre heures qu'on peut en déceler des traces et le maximum, qui est de l'ordre de 10 à 15 mg. par litre, n'est atteint qu'en quarante-huit heures.

On voit donc ici que les conditions de production de la réaction du C.-R. sont encore plus défavorables que dans le cas de l'anaérobiose en eau peptonée simple, puisque le rapport  $\frac{\text{indol}}{\text{nitrites}}$  est de

l'ordre de  $\frac{1}{2}$ . Le C.-R. sera donc de teinte orangée et en général décelable seulement avec un photcolorimètre très sensible.

### III. — MÉCANISME DU C.-R. EN AÉRATION FORCÉE (fig. 4).

Les cultures ont été soumises à une aération continue suffisamment énergique pour maintenir un  $E_H$  constamment positif. Rappelons que par cette technique, et toutes choses égales d'ailleurs, la prolifération des vibrions est toujours fortement accrue et la récolte triplée au minimum.

**1<sup>o</sup> EAU PEPTONÉE SIMPLE.** — *a)* Il est notable que l'aération ne réussit pas à annihiler totalement le pouvoir réducteur du vibrion cholérique. A peine retardée, la quantité de *nitrites* produite reste tout à fait comparable à celle que l'on obtient en eau peptonée aérobiose, et se stabilise vers 20 mg. par litre à la cinquième heure.

*b)* Par contre, la production d'*indol* est à la fois précoce et massive : débutant dès la deuxième heure, elle croît régulièrement jusqu'à atteindre des valeurs inhabituelles en milieux évoluant spontanément. Les taux d'*indol* mesurés en eau peptonée simple aérée sont en effet de l'ordre de 150 à 250 mg. par litre, c'est-à-

dire trois à cinq fois supérieurs à la normale. La teneur en est maximum de douze à vingt-quatre heures, mais elle décroît presque aussi rapidement qu'elle est apparue, et après quarante-huit heures elle a baissé de 75 p. 100 sur son maximum. Cette disparition de l'indol est due à sa volatilité.

Dans ce cas particulier, le C.-R. sera donc mis en évidence avec une intensité remarquable et le rapport  $\frac{\text{indol}}{\text{nitrites}}$  étant très

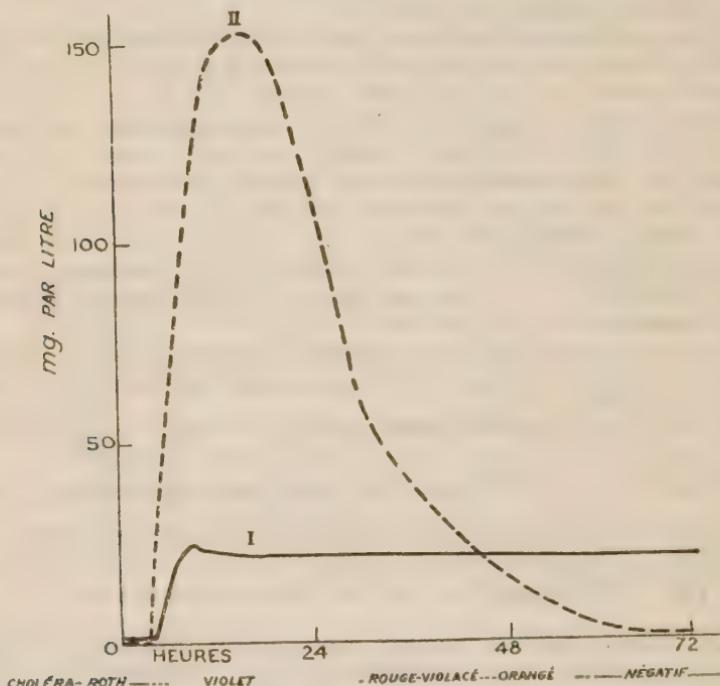


FIG. 4. — C. R. en eau peptonée simple en aération forcée.  
Courbe I, nitrites; courbe II, indol.

élevé (jusqu'à 10), la réaction se manifestera par une teinte violet pur intense et inhabituelle. Toutefois elle devra être recherchée dans des limites horaires bien plus strictes et n'excédant généralement pas quarante-huit heures.

2° EAU PEPTONÉE GLUCOSÉE. — a) La production des nitrites se fait dans le même horaire que dans le cas précédent (eau peptonée simple aérée).

b) La production de l'indol est ici, comme dans le même milieu non aéré, sous la dépendance de la consommation du glucose.

Nous avons étudié l'utilisation de ce sucre par le vibrion cholérique en aérobiose forcée dans un travail précédent [4] : la quantité du glucose consommé atteint des chiffres considérables (par exemple 15 g. p. 1.000 en vingt-quatre heures). Puisque ce sucre est oxydé et non fermenté, il n'y a pas formation d'acidité nocive pour le vibrion : dans ces conditions, les peptones ne sont attaquées et l'indol ne peut être produit qu'après épuisement de tout le glucose du milieu. La production de l'indol est donc d'autant plus tardive que le taux du glucose est plus élevé, et on ne peut fixer son horaire qu'en fonction de ce taux qui est essentiellement variable.

Pratiquement il n'y a donc pas de C.-R. dans ce mode de culture tant qu'il reste du glucose dans le milieu.

Toutefois, et nous l'avons déjà signalé [4], si l'aération est insuffisante il peut y avoir arrêt de la culture par fermentation du glucose avec acidité consécutive. On peut alors déceler des quantités minimes d'indol (2 mg. par litre), provenant de l'autolyse des vibrions en milieu acide. Naturellement dans ce cas le C.-R. de teinte orangé pâle est à peine décelable au photomètre.

#### IV. — ETUDE DU C.-R. EN MILIEU SYNTHÉTIQUE.

Le C.-R., on le sait, se recherche normalement en eau peptonée où le vibrion trouve toujours les deux éléments essentiels à son élaboration : le tryptophane et le nitrate. Ces deux éléments se trouvent également dans le bouillon ordinaire ; mais dans ce milieu composé d'eau peptonée et de macération de viande l'attaque préalable des sucres musculaires retarde l'apparition de l'indol, et tout s'y passe comme dans le cas de l'eau peptonée glucosée.

Il est logique de concevoir un milieu synthétique propre à la recherche du C.-R. dans lequel seront déterminés avec précision les deux facteurs de cette réaction. Nous nous sommes adressé pour cela au milieu minéral K M, que nous avons déjà utilisé fréquemment [3]. Le milieu K M simple ne contenant ni tryptophane, ni nitrate ne convient pas pour cette réaction. L'addition du seul nitrate de potassium à des doses variables de 25 à 100 mg. par litre permet de mettre en évidence la production de nitrite avec un rendement d'environ 75 p. 100 en quatre jours, sensiblement le même qu'en eau peptonée ordinaire. D'autre part, l'addition du tryptophane seul (100 à 200 mg. par litre) aboutit à la formation d'indol avec un rendement moyen de 70 p. 100 dans le même

temps. Il est donc facile, compte tenu du rapport  $\frac{\text{indol}}{\text{nitrites}}$  optimum, de composer un milieu synthétique donnant une réaction du C.-R. de teinte classique « solférino » en additionnant par exemple le

milieu K. M. de 50 mg. de nitrate de potassium ou de sodium et de 60 mg. de tryptophane par litre.

Dans ce milieu K. M. N. T. où la croissance du V. cholérique est moins rapide qu'en eau peptonée simple, la réaction du R.-R. sera lue de préférence entre quarante-huit et soixante-douze heures, comme le montre la figure 5 où sont tracées les courbes de production de l'indol et des nitrites.

L'emploi du milieu K. M. N. T. nous a permis en outre, en ce qui concerne les nitrites, de noter leur disparition assez rapide : on n'en trouve généralement plus trace après huit jours de culture. Ce fait semble en désaccord avec les données classiques d'après lesquelles le vibron cholérique ne réduirait pas les nitrites. Bien que la diminution du taux des nitrites ne soit guère sensible en

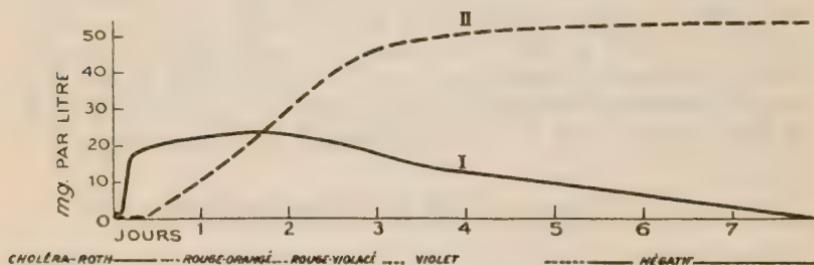


FIG. 5. — C. R. en milieu synthétique en aérobiose.  
Courbe I, nitrites; courbe II, indol.

eau peptonée simple ou glucosée aérobiose ou anaérobiose, on peut toutefois la déceler aussi en eau peptonée aérée. Cette dernière observation jointe au fait que la teneur des nitrites diminue au fur et à mesure que le potentiel d'oxydo-réduction des cultures augmente pouvait donner à penser qu'il s'agissait d'un phénomène réversible. Il n'en est rien : on ne trouve pas trace de nitrates dans les vieilles cultures.

C'est donc là un fait nouveau, demandant des travaux ultérieurs, et susceptible de faire réviser les données classiques sur le métabolisme du vibron cholérique s'il se confirme que ce germe est capable, dans certaines conditions, non seulement de réduire les nitrates en nitrites mais de transformer ultérieurement les nitrites, comme le font les microbes dénitritifiants.

#### DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.

De ce travail, où nous avons pu mettre séparément en évidence les deux facteurs de la réaction indol-nitreuse, il semble possible de tirer les conclusions suivantes :

1° La production des *nitrites* est à peu près indépendante du

mode de culture. Nous avons vu qu'elle se fait, dans tous les cas examinés, sensiblement dans les mêmes conditions de temps et de quantité.

Dans les conditions de culture normale en eau peptonée simple « aérobie », la teneur des nitrites atteint rapidement un niveau maximum constant ; ceci est en accord avec les travaux de Hirsch.

Par contre, dans certaines conditions (milieux aérés, milieu synthétique) les nitrites sont transformés secondairement. Ceci est nettement en désaccord avec les données classiques sur la biochimie du vibron cholérique, et nous nous proposons de poursuivre nos recherches sur ce point essentiel.

2<sup>o</sup> La production de l'indol diffère en temps et en quantité suivant le mode de culture et le taux de glucose ajouté au milieu.

En milieu non glucosé, l'indol est produit dès le départ, visible macroscopiquement, de la culture.

En milieu glucosé, il n'est produit qu'après la consommation totale du sucre, à condition toutefois que celle-ci n'ait pas produit une acidité mortelle pour le vibron. D'où existence d'un taux de glucose limite d'une production d'indol suffisante pour un C.-R. positif ; ce taux ne dépasse guère 1,5 p. 1.000. Ce mécanisme très simple (qui se juxtapose à celui qu'ont observé Happold et Hoyle [40] pour le colibacille) et qui paraissait *a priori* évident, n'a pourtant pas rallié tous les auteurs. En effet, Horner [41], travaillant avec le *B. coli*, a émis l'hypothèse d'une combinaison chimique glucose-tryptophane échappant à l'attaque du germe. Enfin, dans le cas du vibron cholérique, le travail tout récent de S. N. Sen [4] (récusant d'ailleurs la théorie de Horner) vise à expliquer l'action inhibitrice du glucose par son pouvoir réducteur. Cet auteur s'appuie sur des expériences qui lui ont permis d'obtenir une réaction du C.-R. positive, même en présence du glucose, par l'addition au milieu d'agents oxydants.

Nos travaux personnels ne nous permettent pas d'adopter les vues de S. N. Sen : d'abord, nous l'avons dit plus haut et la production des nitrites le confirme, le potentiel d'oxydo-réduction du début des cultures du vibron cholérique est le même en eau peptonée, qu'elle soit simple ou glucosée, pendant les seize premières heures : il n'a donc pas d'influence sur l'horaire de production de l'indol qui est différent dans les deux cas. Dans la suite, de la culture, il convient de distinguer le potentiel d'oxydo-réduction, suivant le taux du glucose initial et l'acidité produite : si le pH atteint reste supérieur à 7, la culture se poursuit normalement pendant quelques jours (en moyenne sept jours) et la production d'indol a lieu, comme dans le cas de l'eau peptonée simple, à un  $E_{\text{h}}$  négatif. Si le pH est nettement abaissé vers 5.8 la culture meurt rapidement sans qu'il y ait eu production d'indol ; on observe dans ce cas, vers la vingt-quatrième heure, un renversement brusque du  $E_{\text{h}}$  qui devient nettement positif.

En somme, dans le premier cas (glucose  $\leq 1,5$  p. 1.000) : production d'indol en réduction prolongée ; dans le deuxième cas (glucose  $\geq 3$  p. 1.000) : non production d'indol en réduction suivie d'oxydation.

On peut observer pour les taux intermédiaires de glucose (pH minimum compris entre 7 et 6) des traces d'indol à des potentiels voisins de la neutralité.

L'ensemble de nos observations nous permet donc d'affirmer qu'en milieu glucosé la production d'indol, et par suite le C.-R., ne sont pas sous la dépendance du potentiel d'oxydo-réduction.

Par contre, les expériences de S. N. Sen, démontrant que l'addition de corps oxydants à l'eau peptonée glucosée augmente la limite permise de ce sucre pour obtenir un C.-R. positif, trouvent une explication immédiate dans les conclusions de notre dernier travail sur l'utilisation du glucose par le *V. cholérique* en aération forcée [4]. Nous avons montré en effet que l'utilisation du glucose lorsqu'elle se fait en oxydation n'est plus limitée, comme dans le cas de la fermentation, par une acidité mortelle. Le vibrion peut donc en milieu oxydant consommer ce sucre en totalité à des taux très supérieurs à ceux permis par un milieu normal, et attaquer secondairement les peptones avec production d'indol.

3° Les horaires de production des nitrites d'une part, et de l'indol d'autre part, ainsi connus, nous voyons donc que la positivité de la réaction du C.-R. est commandée le plus généralement par la production de l'indol.

Il n'est pas possible d'indiquer un seuil d'apparition du C.-R. car la réaction positive varie à la fois en intensité et en couleur, en rapport avec les quantités relatives de l'indol et des nitrites. Néanmoins on peut noter qu'une teinte orangée correspondant au rapport :

$$\frac{\text{indol}}{\text{nitrites}} < 1$$

est décelable à l'œil nu lorsque l'indol se trouve à la dose de 10 mg. La teinte rouge « *solférino* » correspond en général à un rapport  $\frac{\text{indol}}{\text{nitrites}}$  compris entre 1 et 2, soit, pour une intensité moyenne, 40 mg. d'indol pour 25 mg. de nitrites. La couleur *violet pur* indique un rapport :

$$\frac{\text{indol}}{\text{nitrites}} > 2$$

c'est-à-dire, dans la majorité des cas, une teneur d'indol supérieure à 50 mg. par litre. Nous serons peut-être à même de préciser ultérieurement l'origine de ces variations de teintes par des recherches spectroscopiques.

## RÉSUMÉ.

Le dosage séparé des deux facteurs (nitrites et indol) de la réaction du *C.-R.* nous a permis de préciser l'horaire optimum de la recherche de cette réaction en différentes conditions de culture du vibrion cholérique. Le cas des milieux glucosés a été examiné particulièrement : le mécanisme du *C.-R.* y est simple et ne requiert pas d'autre explication que celle de la pré-utilisation du glucose qui doit être totale, ceci n'étant possible que dans certaines limites.

Compte tenu de cette restriction, il est toujours possible de mettre en évidence le *C.-R.* dans une culture de *V. cholérique* en activité à un instant déterminé qui varie suivant le mode (aérobie, anaérobiose ou aéré) de cette culture.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] SEN (S. N.). *Ind. J. Med. Res.*, 1946, **34**, 151.
- [2] SEN (S. N.), BASU (P. N.) et CHAKRABORTY (D. C.). *Ibid.*, 1946, **34**, 157.
- [3] GALLUT (J.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 154.
- [4] GALLUT (J.). *Ibid.*, 1947, **73**, 650.
- [5] BONÉT-MAURY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 197.
- [6] HAPPOLD (F. C.) et HOYLE (L.). *Biochem. J.*, 1934, **28**, 1171.
- [7] DENIGÈS (G.), CHALLE (L.) et LABAT (A.). *Précis de Chimie Analytique* (N. Maloine, Paris, 1930).
- [8] HIRSCH (J.). *Zeitschr., Hyg. u. Infektionskr.*, 1924, **102**, 503.
- [9] HIRSCH (J.). *Ibid.*, 1926, **106**, 433.
- [10] HAPPOLD (F. C.) et HOYLE (L.). *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 136.
- [11] HORNER (A.). *J. Hyg. Camb.*, 1916, **15**, 401.

## RECHERCHES CONCERNANT L'ALEXINE

### III. — ACTION DES ESTERS SULFURIQUES POLYSACCHARIDIQUES EFFET ANTAGONISTE DES COLORANTS BASIQUES

par W. MUTSAARS et L. LISON.

(*Laboratoires de Bactériologie et d'Histologie.  
Faculté de Médecine. Université libre de Bruxelles.*)

L'héparine étant un ester sulfurique polysaccharidique, il était naturel d'éprouver le pouvoir anticoagulant d'autres esters polysaccharidiques obtenus par synthèse. Bergström [1], faisant agir de l'acide chlorosulfonique sur de la cellulose, de la chitine, du glycogène, de l'amidon, de la gomme arabique, etc..., en milieu pyridinique, a obtenu les esters sulfuriques correspondants. Tous ces esters ont une action anticoagulante plus ou moins marquée ; les esters de mono et disaccharides, au contraire, n'en ont aucune.

Comme, d'autre part, l'héparine a une action antialexique [2, 3, 4, 5], par inhibition des fractions thermolabiles, il était également naturel d'essayer l'action sur l'alexine de ces anticoagulants synthétiques. Ecker et Pillemer [4] ont étudié l'ester sulfurique de la cellulose et l'ester sulfurique polyvinyle. Ils ont constaté que ces composés étaient doués d'un pouvoir antialexique marqué, agissant à des concentrations de soixante-quinze à cent fois plus faibles que l'héparine, tout en ne possédant que 1,15 du pouvoir anticoagulant de celle-ci. D'après ces auteurs, l'effet de ces substances, qui ont un poids moléculaire très élevé et possèdent des groupements acides puissants, peut s'expliquer soit par l'action de ces groupements acides sur l'alexine, soit par rupture de l'équilibre sérique naturel. Ecker et Pillemer sont d'avis que ces agents détruisent les fractions thermolabiles de l'alexine, sans qu'il y ait une action sélective sur l'un ou l'autre composant.

L'un de nous [6], au cours d'une étude sur le phénomène de métachromasie, a pu établir que le virage métachromatique était caractéristique des esters sulfuriques (composés du type  $R.O.SO_3H$ ) de poids moléculaire élevé. Le pouvoir métachromatique d'un ester croît d'ailleurs en fonction de ce poids.

Nous avons étudié l'influence sur l'alexine de trois esters sulfu-

riques, ceux de la cellulose, de l'amidon et du saccharose. Ces substances ont été préparées suivant les techniques indiquées par Lison [6].

Nous avons constaté que l'ester sulfurique de la cellulose (E. S. C. par abréviation) sous forme de son sel de sodium, inhibe l'action de l'alexine ; 0,2 à 0,4 mg. de cet ester inactivent 1 cm<sup>3</sup> d'alexine non diluée. En ce qui concerne l'ester sulfurique de l'amidon, la dose inhibante pour 1 cm<sup>3</sup> d'alexine est également de 0,2 mg.

Au contraire, l'ester sulfurique du saccharose, même à dose de 100 mg. par centimètre cube d'alexine, n'a aucune action.

Ces résultats concordent avec ceux d'Ecker et Pillemer. Comme ces auteurs, nous admettons que pour qu'un glucide manifeste des propriétés antiallexiques, il faut qu'il présente : 1<sup>o</sup> un poids moléculaire élevé, 2<sup>o</sup> des groupements acides.

Ces esters polysaccharidiques agissent-ils sur un, plusieurs ou sur la totalité des composants de l'alexine ?

Rappelons que les quatre composants connus de l'alexine se fixent dans l'ordre suivant : C'4, C'1, C'2, enfin agirait C'3 qui, toutefois, se retrouverait libre après l'hémolyse. La fixation d'un composant conditionnant celle du suivant, nous avons d'abord examiné le cas du quatrième composant, qui est thermostable et est détruit par contact de l'alexine avec des solutions diluées d'ammoniaque ou de sels ammoniacaux.

#### ACTION DE L'E. S. C. SUR C'4.

Préparons deux tubes contenant 0,5 cm<sup>3</sup> d'alexine de cobaye inactivée par chauffage à 56° pendant vingt minutes ; ajoutons au tube 1 0,2 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique, au tube 2 0,2 cm<sup>3</sup> d'une solution en eau physiologique d'E. S. C. à 1 mg. par centimètre-cube. Après séjour de trente minutes à 37°, portons au 1/10 la dilution du sérum chauffé dans ces deux tubes par addition de 4,3 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique et ajoutons à chacun de ces tubes 1 cm<sup>3</sup> d'une suspension de globules rouges de mouton fortement sensibilisés et lavés une fois après sensibilisation. Après nouveau séjour de trente minutes à l'étuve, centrifugeons les deux tubes et recueillons les deux culots, en les ramenant au volume initial par addition d'eau physiologique. Nous avons préparé, d'autre part, deux séries identiques de tubes contenant des quantités décroissantes d'alexine traitée par l'ammoniaque, donc dépourvue de quatrième composant. Ajoutons à chaque tube d'une de ces séries une goutte de globules rouges provenant du tube 1, et faisons de même pour l'autre série, en utilisant toutefois des globules du tube 2. Après séjour de trente minutes à 37°, nous constatons que dans les deux séries, les tubes présentent le même

aspect : hémolyse complète dans les tubes contenant les quantités les plus fortes d'alexine traitée par l'ammoniaque, diminuant progressivement d'intensité pour devenir nulle à mesure que la dilution augmente. Un tube témoin contenant une goutte de globules sensibilisés n'ayant pas séjourné au contact de sérum chauffé et 1 cm<sup>3</sup> d'alexine privée de C'4 et diluée au 1/10 ne montre aucune hémolyse.

De cette expérience il résulte que la première étape de la fixation de l'alexine, c'est-à-dire la fixation du quatrième composant, s'effectue malgré la présence d'E. S. C.

Une variante de cette expérience consiste à remplacer le sérum chauffé par de l'alexine fraîche, à laquelle on ajoute de l'E. S. C. à raison de 0,4 mg. par centimètre cube. Bien entendu, des globules rouges sensibilisés, mis au contact de cette alexine, ne s'hémolysent pas. Après centrifugation, le culot de globules rouges, resuspendu en eau physiologique, est distribué à raison d'une goutte par tube dans une série de tubes contenant des quantités décroissantes d'alexine privée de C'4. Le résultat est le même : hémolyse complète allant en décroissant à mesure que la dilution de l'alexine sans C'4 augmente. Mais si, au lieu d'ajouter à ces globules de l'alexine privée de C'4, on se contente de les suspendre en eau physiologique, après avoir éliminé le liquide contenant l'E. S. C., ils ne s'hémolysent pas.

Malgré la présence d'E. S. C., le quatrième composant, qu'il provienne de l'alexine ou du sérum chauffé, se fixe donc sur les globules sensibilisés.

#### ACTION DE L'E. S. C. SUR LA FIXATION DE C'1.

Scindons de l'alexine en ses chaînons moyen et terminal par barbotage de CO<sub>2</sub> dans de l'alexine diluée au 1/10 en eau distillée. Divisons la solution de chaînon moyen (qui contient également du C'4) en deux parts : 1<sup>o</sup> ajoutons à 9,6 cm<sup>3</sup> de la solution de C'1 au 1/10, 0,4 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique ; 2<sup>o</sup> au même volume de C'1 0,4 mg. d'E. S. C.

Etablissons ensuite une série de dilutions croissantes de chaîne de ces dilutions de C'1, ajoutons à chaque tube une goutte de globules rouges sensibilisés et après séjour de trente minutes à 37°, centrifugeons les tubes pour éliminer les liquides surnageants. Nous remplissons ceux-ci, dans chaque tube, par 1 cm<sup>3</sup> de la solution de chaînon terminal diluée au 1/10 et après nouveau séjour de trente minutes à 37°, la lecture nous révèle que dans le cas des globules ayant séjourné au contact de C'1 seul, sans E. S. C., l'addition ultérieure de chaînon terminal a provoqué une hémolyse qui, complète pour les tubes contenant des globules

ayant subi le contact de quantités relativement fortes de C'1, diminue avec la dilution du C'1.

Au contraire, les globules ayant subi le contact de C'1 contenant de l'E. S. C. ne s'hémolysent pas par addition de chaînon terminal. Par conséquent, comme nous savons déjà que la présence d'E. S. C. n'empêche par la fixation de C'4, c'est bien, dans cette expérience, sur C'1 que l'E. S. C. exerce son action empêchante.

#### ACTION DE L'E. S. C. SUR LA FIXATION DE C'2.

Ajoutons à 30 cm<sup>3</sup> de solution de chaînon moyen diluée au 1/10, 5 cm<sup>3</sup> de globules rouges sensibilisés et, après contact de trente minutes à 37° et centrifugation, recueillons le culot de globules ayant fixé C'4 et C'1. Ramenons ce culot à son volume initial par addition d'eau physiologique. Nous ajoutons à chaque tube d'une série contenant du chaînon terminal en dilution croissante une goutte de ces globules. Après séjour à l'étuve, nous constatons l'hémolyse des globules, allant en diminuant à mesure que les quantités de chaînon terminal diminuent. Ajoutons, d'autre part, à 30 cm<sup>3</sup> d'une solution de chaînon terminal contenant en plus 1,2 cm<sup>3</sup> d'une solution à 1 mg. par centimètre cube d'E. S. C., le restant des globules sensibilisés ayant subi le contact du chaînon moyen et portons à 37° pendant une heure. Nous constatons que ces globules ne s'hémolysent pas. Cette absence d'hémolyse peut être due à la neutralisation ou à l'absence de fixation de C'2 ou de C'3 ou de ces deux composants simultanément. Nous verrons que c'est cette dernière hypothèse qui se vérifie, mais comme, en ce moment, nous envisageons l'action de l'E. S. C. sur C'2, il s'agit d'éliminer son action éventuelle sur C'3.

A cet effet, centrifugeons le mélange de globules sensibilisés + C'1 ayant subi le contact du chaînon terminal + E. S. C., ramenons le culot de globules au volume initial et déposons une goutte de ceux-ci dans une série de tubes contenant des quantités décroissantes de sérum chauffé. Nous fournissons ainsi à ces globules qui ont fixé C'4 et C'1, du C'3 : il se lyseront donc s'ils ont fixé du C'2 malgré la présence d'E. S. C., même si, au cours de cette fixation, l'E. S. C. a empêché le C'3 d'agir. Au contraire, ils ne se lyseront pas, même en présence de C'3, si l'E. S. C. a empêché la fixation de C'2. C'est d'ailleurs cette dernière éventualité qui se réalise.

#### ACTION DE L'E. S. C. SUR C'3.

Privons 2 cm<sup>3</sup> d'alexine de son C'3 en la traitant par 10 cm<sup>3</sup> d'une suspension à 1 p. 100 de levure dans de l'eau physiologique. Après une heure quinze à 37°, centrifugeons et recueillons le

liquide surnageant. Ajoutons à ce liquide 3 cm<sup>3</sup> d'une suspension de globules rouges sensibilisés, laissons trente minutes à 37° puis, après centrifugation, reprenons le culot de globules que nous ramenons au volume initial.

A raison d'une goutte par tube, répartissons ces globules dans deux séries de tubes, contenant des dilutions croissantes de sérum chauffé vingt minutes à 56°, auquel on a ajouté soit 0,4 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique, soit 0,4 cm<sup>3</sup> d'une solution d'E. S. C. à 1 mg. par centimètre cube pour chaque centimètre cube de sérum. Après séjour à l'étuve, nous constatons que dans la première série (sérum chauffé + E. P.) il y a hémolyse, de complète elle va en diminuant selon la dilution du sérum chauffé. Dans la deuxième série (sérum chauffé + E. S. C.), aucun tube ne présente de l'hémolyse.

Ainsi les globules, sur lesquels s'étaient fixés C'4, C'1, C'2 ne se lysent pas en présence de C'3 + E. S. C.

Une variante de cette expérience, obtenue en remplaçant le sérum chauffé par de l'alexine traitée par l'ammoniaque, alexine à laquelle on a ajouté de l'E. S. C., donne un résultat semblable.

L'ester sulfurique de la cellulose, auquel on peut d'ailleurs substituer l'ester sulfurique de l'amidon, agit sur les deux composants thermolabiles de l'alexine et également sur C'3, composant thermostable ; il n'agit pas sur l'autre composant thermostable : C'4.

#### EFFET ANTAGONISTE DES COLORANTS BASIQUES.

En examinant l'effet métachromatique de l'E. S. C. sur le bleu de toluidine, nous avons observé la formation d'un précipité lors de l'addition, à 1 cm<sup>3</sup> de la solution à 1 mg. par centimètre cube, d'une goutte d'une solution à 1 p. 100 de bleu de toluidine. Ceci nous a incités à étudier l'effet du bleu de toluidine sur la réaction entre l'E. S. C. et l'alexine.

Préparons trois séries identiques de tubes contenant des quantités décroissantes d'E. S. C., à savoir : 0,2 mg. ; 0,1 mg. ; 0,05 mg. et 0,01 mg., ainsi qu'un tube témoin sans E. S. C. Ajoutons à chacun des tubes de la série A une goutte de la solution de bleu de toluidine, puis aux tubes des trois séries 0,5 cm<sup>3</sup> d'alexine. Après trente minutes à 37°, ajoutons aux tubes de la série B une goutte de bleu. Nous titrons à ce moment le pouvoir alexique des tubes des trois séries, la série A étant composée de tubes où le bleu de toluidine a réagi avec l'E. S. C. avant l'addition d'alexine, la série B étant formée de tubes où l'E. S. C. a réagi avec l'alexine avant l'addition de bleu, enfin la série C étant formée de tubes témoins, sans addition de bleu de toluidine.

Le bleu de toluidine exerce une action empêchante très nette (série A) sur l'E. S. C. ; d'autre part, sa présence dans le tube

TABLEAU I.

E. S. C. par centimètre cube d'alexine	SÉRIE A				SÉRIE B				SÉRIE C			
	0,4 mg.	0,2 mg.	0,1 mg.	0,08 mg.	0,4 mg.	0,2 mg.	0,1 mg.	0,08 mg.	0,4 mg.	0,2 mg.	0,1 mg.	0,08 mg.
Alexine :												
1/10 1 cm <sup>3</sup> . . . . .	0	C	C	C	C	0	C	C	0	0	C	C
0,5 cm <sup>3</sup> . . . . .	0	C	C	C	C	0	C	C	0	0	C	C
0,25 cm <sup>3</sup> . . . . .	0	C	C	C	C	0	C	C	0	0	C	C
0,10 cm <sup>3</sup> . . . . .	0	C	C	C	C	0	PC	G	0	0	C	C
1/100 0,5 cm <sup>3</sup> . . . . .	0	PC	C	PC	PC	0	0	PC	PC	0	0	Inc.
0,25 cm <sup>3</sup> . . . . .	0	0	Inc.	Inc.	Inc.	0	0	Inc.	Inc.	0	Inc.	Inc.

témoin, sans E. S. C. ne modifie en aucune façon le titre de l'alexine. De plus (série B.), le bleu de toluidine, ajouté après réaction entre l'E. S. C. et l'alexine, est capable, dans une très large mesure, de réactiver l'alexine. Ceci nous montre que l'E. S. C. n'agit pas, comme le pensent Ecker et Pillemer, en détruisant des composants de celle-ci.

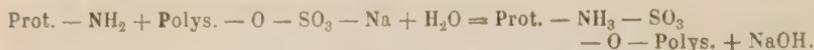
Nous avons ensuite éprouvé l'action d'autres colorants sur l'E. S. C. Nous en donnons la liste ci-après. On voit qu'il n'y a aucun parallélisme entre l'effet métachromatique et l'action de ces colorants sur l'E. S. C., mais qu'il y a une relation très nette entre cette action et le caractère électropolaire du colorant. Les

TABLEAU II.

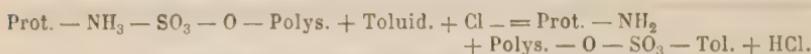
COLORANT	EFFET sur la réaction E. S. C. + alexine	MÉTACHROMASIE	CARACTÈRE du colorant
Chrysoidine (Grübler) . . . . .	0	0	Basique.
Safranine T (Merck) . . . . .	+++	+	Basique.
Rouge neutre (Merck) . . . . .	+	+	Basique faible.
Bleu de toluidine (Merck) . . . . .	+++	+	Basique.
Vert de méthyle (Microcolor) . . . . .	++	0	Basique.
Bleu de crésyle (Microcolor) . . . . .	+	+	Basique.
Thionine (Grübler) . . . . .	+++	+	Basique.
Vert Janus (Meister Lucius) . . . . .	+++	+	Basique.
Trypaflavine . . . . .	+++	0	Basique.
Eosine orange (Grübler) . . . . .	0	—	Acide.
Erythrosine (Ral) . . . . .	0	—	Acide.
Vert lumière (Geigy) . . . . .	0	—	Acide.
Cyanol (Hollborn) . . . . .	0	—	Acide.
Bleu trypan (Geigy) . . . . .	0	—	Acide.

colorants basiques empêchent l'action de l'E. S. C., les colorants acides n'ont pas cet effet.

A la seule exception de la chrysoïdine, tous les colorants basiques essayés se sont montrés actifs. Ces faits sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les esters sulfuriques des polysaccharides agissent par leurs groupements acides sur certains composants de l'alexine. On pourrait admettre une action sur les groupements basiques des protéines alexiques, aboutissant à la formation d'un complexe faiblement ionisé.



Ce complexe réagirait avec un colorant basique, par formation d'un complexe moins soluble, de façon à libérer les groupements aminés de la protéine.



Les composants bloqués par l'ester sulfurique ne pourraient se fixer sur les globules sensibilisés.

Seul compte le caractère basique du colorant, puisque des colorants appartenant à des groupes très différents se sont montrés actifs. C'est ainsi que le vert de méthyle dérive du triphényle-méthane ; le bleu de crésyle appartient au groupe des oxazines ; la thionine et le bleu de toluidine sont des thiazines ; le rouge neutre, la safranine et le vert Janus des azines et la trypaflavine appartient au groupe de l'acridine.

L'effet antagoniste de ces colorants sur la réaction entre l'E. S. C. et l'alexine, leur pouvoir de dissocier le complexe formé, est mis en évidence par l'expérience suivante.

A 7 tubes, mis à 37° et contenant tous 0,2 cm<sup>3</sup> d'une solution d'E. S. C. à 1 mg. par centimètre cube, ajoutons 0,5 cm<sup>3</sup> d'alexine, puis immédiatement au premier une goutte de bleu de toluidine à 1 p. 100. Ajoutons ensuite successivement une goutte de bleu aux autres tubes, à raison d'un tube toutes les quinze minutes, le septième tube n'en recevant pas.

Nous avons ainsi une série de tubes où l'alexine et l'E. S. C. ont été en contact pendant des temps de plus en plus longs avant l'addition du bleu, temps s'échelonnant entre zéro heure et une heure quinze. Si nous titrons après ce séjour de une heure quinze à 37° le pouvoir alexique de ces tubes, nous constatons qu'il est sensiblement le même partout, et égal à celui d'un tube témoin d'alexine sans E. S. C. et sans bleu de toluidine, ou d'un autre tube d'alexine n'ayant reçu que du bleu. Bien entendu le septième tube : alexine + E. S. C. est dépourvu de tout pouvoir hémolytique.

Le bleu de toluidine est donc capable de dissocier le complexe formé, malgré un contact prolongé entre l'E. S. C. et l'alexine.

Comme nous l'avons signalé, des globules rouges sensibilisés, mis au contact d'E. S. C. et d'alexine ne s'hémolysent pas, quand, après centrifugation pour éliminer le liquide surnageant chargé d'E. S. C., on les resuspend en eau physiologique. L'addition de bleu de toluidine à ces globules resuspendus ne change rien à cet état de choses, ces globules n'ayant fixé, au contact de l'alexine + E. S. C., que le C'4. Cependant le liquide surnageant, auquel on ajoute du bleu de toluidine, hémolyse parfaitement des globules sensibilisés neufs : son titre en alexine est égal à celui d'une alexine témoin, non traitée par des globules sensibilisés. Il faut donc admettre que les globules n'absorbent pas la totalité du C'4 présent.

Bien entendu, les colorants basiques faisant récupérer à l'alexine traitée par l'E. S. C. toute son activité, il faut, nécessairement, que ces colorants permettent la fixation des 3 composants atteints par l'E. S. C. Sans entrer dans des détails, disons que c'est ce que nous avons observé.

Si l'on répète les expériences consacrées à l'action de l'E. S. C. sur la fixation de C'1, C'2 et C'3, en ajoutant toutefois des quantités appropriées de bleu de toluidine ou de vert Janus, par exemple, on constate alors que ces composants se fixent ou agissent fort bien, malgré la présence d'E. S. C.

Une remarque s'impose cependant ici. Cette action des colorants basiques n'est efficace que pour autant que les composants ne soient pas fixés sur les globules. Le résultat est tout différent si nous faisons agir l'E. S. C. sur un composant déjà fixé sur le globule.

Scindons, par barbotage de  $\text{CO}_2$ , de l'alexine diluée au 1/10 en eau distillée en ses chaînons « moyen » et « terminal ». Préparons deux tubes identiques contenant  $2,5 \text{ cm}^3$  de globules rouges de mouton, sensibilisés et lavés, ajoutés à  $15 \text{ cm}^3$  d'une solution diluée au 1/10 de chaînon « moyen ».

Après un séjour de trente minutes à  $37^\circ$ , suffisant pour obtenir la fixation de C'4 et C'1 sur les globules, ajoutons à l'un des tubes  $0,6 \text{ cm}^3$  d'une solution à 1 mg. par centimètre cube d'E. S. C., à l'autre  $0,6 \text{ cm}^3$  d'eau physiologique.

Après nouveau séjour de quinze minutes à  $37^\circ$ , centrifugeons les deux suspensions et recueillons les culots. Nous disposons ainsi de deux espèces A et B de globules, ayant toutes deux fixé C'4 et C'1, mais dont l'une (B) a, de plus, été au contact d'E. S. C. après fixation des composants.

Préparons, d'autre part, deux séries I de dilutions appropriées de chaînon « terminal », deux autres séries II ne différant des premières que par l'addition de bleu de toluidine. Ajoutons les

globules A à une série I et à une série II, faisons de même pour les globules B.

Après séjour à l'étuve, nous constatons que les globules A, qui ont fixé le chaînon moyen, se sont lysés, comme il se doit, en présence de chaînon terminal, que celui-ci contienne ou non du bleu de toluidine.

Au contraire, les globules B sont restés intacts en présence de chaînon terminal avec ou sans toluidine.

Ainsi l'E. S. C., qui s'unit au chaînon moyen déjà fixé sur le globule sensibilisé, empêche non seulement l'action du chaînon terminal, mais son union avec le chaînon moyen n'est pas dissociée par le bleu de toluidine.

Puisque le complexe E. S. C.-C'1 libre est aisément dissociable par un colorant basique, cette expérience nous montre que l'E. S. C. ajouté à de l'alexine agit sur le C'1 de celle-ci en l'empêchant de se fixer sur le globule sensibilisé.

#### Résumé.

1° Les esters sulfuriques des polysaccharides agissent sur l'alexine en empêchant la fixation de C'1 et C'2 ainsi que l'action de C'3;

2° Un ester sulfurique d'un disaccharide n'a aucune action sur l'alexine;

3° Les colorants basiques s'opposent à l'action des esters sulfuriques, les colorants acides n'ont aucun effet;

4° Les composants de l'alexine atteints par les esters ne sont nullement détruits, même après contact prolongé.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERGSTRÖM. *Naturwissenschaft.*, 1935, **23**, 706 ; *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1936, **238**, 163.
- [2] ECKER (E. E.) et GROSS (P.). *J. Infect. Dis.*, 1929, **44**, 250.
- [3] GROSS (E.) et ECKER (E. E.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1929, **26**, 508.
- [4] ECKER (E. E.) et PILLEMER. *J. Immunol.*, 1941, **40**, 73.
- [5] MUTSAARS (W.) et BARTHELS-VIROUX (J.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 451.
- [6] LISON (L.). *Arch. Biol.*, 1935, **46**, 599.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.*)

**Séance du 6 novembre 1947.**

Présidence de M. MAGROU.

---

M. Magrou prend séance et prononce l'allocution suivante :

Mesdames, Messieurs,

En prenant possession de ce fauteuil, mon premier devoir est de vous remercier de l'honneur que vous m'avez fait en m'appelant à la présidence de notre Société. Mais à la fierté que j'éprouve à prendre la direction de vos savants débats se mêle quelque inquiétude ; je succède, en effet, au meilleur des présidents, notre éminent collègue et ami le Dr Nègre, qui occupait cette place avec toute l'autorité que lui confère une œuvre scientifique de premier ordre, et aussi avec cette courtoisie, cette bienveillance, cette gentillesse qui sont le fond de sa nature et que connaissent bien tous ceux qui ont la bonne fortune de l'approcher. Je ne puis prétendre à ne pas vous le faire regretter ; je m'efforcerai, tout au moins, de m'inspirer de son exemple. Je compte, pour m'aider dans ma tâche, sur nos dévoués vice-présidents, MM. Gastinel et Dujarric de la Rivière, sur notre secrétaire général, M. Lépine, qui est vraiment la cheville ouvrière de notre Société, sur notre secrétaire général adjoint, M. Jean Levaditi et sur notre nouveau trésorier, M. Wahl.

La Société Française de Microbiologie a subi, hélas ! de lourdes pertes au cours des trois années qui viennent de s'écouler.

Le professeur Nattan-Larrier est un ancien de l'Institut Pasteur, où il a été jadis l'assistant de Laveran. Sous l'impulsion de ce maître, il s'était orienté vers la pathologie exotique et la notoriété qu'il ne tarda pas à acquérir dans ce domaine lui valut bientôt d'occuper une chaire créée pour lui au Collège de France. Ses travaux sur les leishmanioses, les trypanosomiases, la perméabilité placentaire, sont justement estimés. Il avait publié deux volumes d'un *Traité de Microbiologie* et poursuivait cette œuvre monumentale quand il nous a été enlevé.

Philippe Lasseur, professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Nancy, est bien connu par ses beaux travaux, remarquables par leur précision, de bactériologie et de sérologie. C'était un animateur, qui avait su grouper autour de lui une pléiade de disciples

enthousiastes, profondément attachés à leur maître. Il avait pris une part active à la constitution de notre Société.

Citoyen américain, d'ascendance russe, Harry Plotz, après avoir participé à la guerre de 1914, entra à l'Institut Pasteur dans le service du regretté Besredka, où il poursuivit des recherches sur l'immunité vaccinale, la culture *in vitro* du virus de la peste aviaire, du virus vaccinal, du typhus exanthématique, sur l'isolement du virus de la rougeole et sa transmission au singe. Au cours de la dernière guerre, il fut chargé à Washington de la direction du service des maladies rickettiennes. Grand ami de notre pays, Plotz a été un artisan actif et persévérant du rapprochement entre la France et les Etats-Unis.

Alfred Boquet nous a été enlevé, il y a quelques mois à peine, par un mal soudain et implacable. Il avait commencé sa carrière vétérinaire dans le Sud algérien, où il avait été chargé d'organiser la lutte contre la clavelée. Le regretté Albert Calmette et M. Edouard Sergeant l'appelèrent à Alger, pour l'attacher à l'Institut Pasteur d'Algérie nouvellement fondé. C'est là qu'il rencontra notre collègue M. Nègre, à qui il devait rester lié par trente-sept années de travail en commun et d'amitié fraternelle. Leur collaboration débute par un coup de maître : ils résolurent tous les problèmes qui se posaient à propos de la lymphangite épizootique des Solipèdes ; les premiers, ils réussirent à cultiver en série le champignon agent de cette affection, à reproduire la maladie par inoculation de cultures pures, à instituer un traitement spécifique efficace. Si bien que la monographie de Boquet et Nègre sur la lymphangite épizootique peut être proposée comme modèle à tout chercheur qui entreprend l'étude expérimentale d'une maladie infectieuse. En 1919, Boquet et Nègre furent appelés à l'Institut Pasteur de Paris, où ils firent partie de l'équipe quiaida Calmette dans ses recherches sur la tuberculose. Là, Boquet déploya une activité débordante, et je ne puis donner qu'une énumération très incomplète de tous les sujets qu'il aborda : mise au point de la vaccination par le BCG, découverte avec Nègre, de l'antigène méthylique et de ses applications thérapeutiques, recherches expérimentales sur la tuberculose, publication d'ouvrages didactiques. Peu de temps avant de nous quitter, Boquet avait été élu membre de l'Académie de Médecine dans la section vétérinaire.

Paul Jeantet, l'une des figures les plus populaires de l'Institut Pasteur, et lié d'amitié avec la plupart d'entre nous, a disparu en pleine activité au cours de l'hiver dernier. Il assurait depuis près de quarante ans, avec une compétence et un dévouement à toute épreuve, le service de Photomicrographie. Travailleur infatigable, d'une adresse et d'une ingéniosité sans égale, il laisse une collection iconographique unique au monde. Au moyen des techniques photographiques, il réussit à résoudre de difficiles problèmes microbiologiques : morphologie de l'agent de la péripneumonie (avec Borrel, Dujardin-Beaumetz et M. Jeantet) ; structure submicroscopique des aiguilles cristallines de la mosaïque du Tabac (avec notre collègue M. Lépine). Avec M. Jacques Duclaux, il a publié d'importants travaux sur la spectrographie dans l'ultraviolet.

Venu à la Science après sa rencontre avec Carrel, pendant la guerre de 1914, Lecomte du Noüy n'avait pas tardé à acquérir une rare maîtrise dans le domaine de la biophysique. Il travailla d'abord à l'In-

titut Rockefeller, puis fut accueilli à l'Institut Pasteur par M. Roux. Il réussit à déterminer les grandeurs moléculaires par des mesures de tension superficielle. L'ouvrage qu'il publia sur ce sujet dans les monographies de l'Institut Pasteur est un modèle d'élégance et de rigueur expérimentale et de clarté dans l'exposition. Toujours prêt à accueillir avec sympathie les idées neuves, Lecomte du Noüy séduisait par la distinction de sa personne et de son esprit. Il laisse plusieurs ouvrages philosophiques, qui lui ont valu des admirateurs enthousiastes.

Esprit original, savant histologiste et embryologiste, Peyron a dirigé pendant plusieurs années un laboratoire d'anatomie pathologique à l'Institut Pasteur. Il laisse une œuvre considérable, dans laquelle rien n'est indifférent. On lui doit une découverte de haute portée biologique, celle de la parthénogénèse ou, plus exactement, de l'androgénèse dans l'espèce humaine : dans certaines tumeurs du testicule de l'homme, il a décrit, en effet, des formations qui ressemblent à s'y méprendre à des embryons humains au début de leur développement ; particularité remarquable, ces boutons embryonnaires, situés dans le testicule, dérivent non d'ovules, mais de gamètes mâles.

Frédéric Nitti, ravi tout jeune à l'Institut Pasteur et à la science, assurait depuis 1935 la liaison entre le laboratoire de Chimie thérapeutique et le laboratoire de Bactériologie de Salimbeni. Il fut étroitement associé à la découverte, par M. et M<sup>me</sup> Tréfouël, des sulfamides, dont il étudiait, par des expériences minutieuses, l'action sur l'organisme. Pendant l'occupation, au mépris de tout danger, il servit avec enthousiasme, dans la clandestinité, la cause de la France, qu'il avait choisie pour patrie dès 1939.

Chef du service de la peste, qu'il assurait avec une compétence et un zèle exemplaires, Dujardin-Beaumetz avait pris sa retraite il y a quelques années et s'était retiré à Nantes, où, sous l'occupation ennemie, il avait eu à souffrir des bombardements. Son départ de l'Institut Pasteur avait laissé un grand vide parmi nous. Qui ne se souvient de cet aimable collègue, toujours souriant, de sa bonne grâce, de son caractère enjoué, de sa conversation spirituelle ? C'était pour moi une joie de le voir entr'ouvrir la porte de mon laboratoire, où il venait volontiers passer un moment. Il s'est montré un précurseur dans un domaine appelé par la suite à une destinée éclatante, celui des antibiotiques. Il avait découvert une bactérie, qu'il nomma antibiocoque, qui a la propriété d'arrêter la croissance de divers germes Gram-positifs, des bacilles diphtériques et diphtéroïdes entre autres. Le phénomène d'inhibition qu'il avait ainsi mis en évidence était d'une netteté et d'une beauté saisissantes. Mais dans l'excès de sa modestie, il négligea d'en tirer parti. Et, tandis que des découvertes similaires connaissaient un avenir glorieux, la sienne passa à peu près inaperçue. J'accomplis un acte de justice en la rappelant à votre attention et en plaçant ce chercheur modeste et désintéressé au rang qui lui est dû.

Edouard Chatton avait été l'assistant du regretté professeur Mesnil. Après la paix de 1919, il soutint sa thèse de doctorat ès sciences, monographie monumentale sur les Flagellés Péridiniens. Il quitta alors l'Institut Pasteur pour entrer dans l'Université. Après avoir occupé en province plusieurs chaires de Zoologie, il succéda à Duboscq dans la direction du Laboratoire Arago à Banyuls-sur-Mer,

avec le titre de professeur à la Sorbonne. C'est là qu'il vient de succomber, après une longue et cruelle maladie. Son œuvre est considérable ; elle comprend, d'une part, des recherches sur les Protozoaires pathogènes ou parasites ; d'autre part, des études de zoologie marine portant principalement sur de nombreux groupes de Protistes. Elle se recommande par de nombreux résultats de grande portée, et par la perfection impeccable de son exécution. Ajoutons que Chatton était doué d'un beau talent de dessinateur et de peintre. Il était, depuis 1933, correspondant de l'Académie des Sciences pour la Section d'Anatomie et de Zoologie.

Serge Metchnikoff, contraint après la guerre de 1914-1918 de fuir sa patrie en proie à la révolution, trouva un refuge à l'Institut Pasteur, où il fut accueilli avec empressement par M. Roux. Il était dès ce moment un zoologiste de grande réputation. Dans son laboratoire de la rue Falguière, il poursuivit des recherches profondément originales sur l'infection et l'immunité chez les insectes, et sur la lutte contre les ennemis des cultures au moyen de parasites entomophages.

Pierre Mazé, chef du Service de Chimie et Bactériologie agricoles à l'Institut Pasteur, était l'un des plus anciens travailleurs de la maison, où il était entré en 1896. Ses recherches, universellement connues et devenues classiques, portent sur l'étude de la nutrition des plantes au moyen de la méthode des cultures aseptiques, sur la signification physiologique des fermentations et sur la nutrition carbonée des végétaux et des microbes, sur les fermentations spéciales, sur la fabrication du beurre et des fromages. Il fut le premier à montrer que le *Rhizobium radicicola* enrichit en azote combiné les milieux artificiels où on le cultive. Sa méthode technique de culture aseptique des plantes vertes en milieux synthétiques est d'un usage courant dans tous les laboratoires de physiologie végétale.

A côté de ce vétéran de la bactériologie, un autre de nos collègues nous a été enlevé tout jeune : Sarciron, de l'annexe de Garches, a succombé à quarante ans, au moment où il poursuivait d'intéressantes recherches sur des problèmes d'immunologie. C'était un des espoirs de l'Institut Pasteur, et nous avons douloureusement ressenti sa perte prématurée.

Jean Régnier, professeur de microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris, a succombé en 1946, en pleine activité. Son œuvre scientifique, qu'il a poursuivie avec un courage admirable malgré une santé chancelante, témoigne du souci de la précision et du désir d'approfondir les problèmes biologiques auxquels il s'est attaqué. Elle porte sur la bactériologie, avec des recherches sur les antiseptiques et sur la pharmacodynamie (recherches sur les anesthésiques locaux).

Nous nous inclinons pieusement devant nos Collègues disparus. Nous nous engageons à entretenir fidèlement le culte de leur mémoire et nous adressons à leurs familles l'expression de nos condoléances émues.

## COMMUNICATIONS

**L'ADDITION DE LATEX D'*HEVEA BRASILIENSIS*  
AU VACCIN ANTIRABIQUE FORMOLÉ  
EN VUE D'AUGMENTER SON ACTIVITÉ**

par H. JACOTOT.

Nous avons fait connaître ailleurs (1) que le latex d'*Hevea brasiliensis*, source la plus commune de caoutchouc naturel, est susceptible d'augmenter notablement le pouvoir immunisant de divers vaccins avirulents constitués par des émulsions de microbes figurés ou par des émulsions de tissus électivement chargés de virus pathogènes. Voici quelques précisions relativement à l'action de cet adjuvant sur les émulsions de substance nerveuse rabique traitées par le formol.

Le mélange est obtenu de la façon suivante :

On prépare, selon la technique qui a été exposée ici même antérieurement (2), une émulsion formolée d'encéphales de chiens préalablement inoculés de virus fixe. L'émulsion vaccinale considérée comme terminée est divisée en deux parties égales ; à l'une on ajoute une quantité de latex représentant le dixième du poids de la pulpe nerveuse contenue dans le vaccin, on mélange et on complète avec de l'eau pour que l'émulsion finale soit au cinquième ou au sixième. La deuxième partie qui servira de vaccin-témoin est complétée au même volume avec de l'eau. Ainsi que nous l'avons déjà signalé, la préparation du latex nécessite quelques précautions qui visent à empêcher la flocculation ou la formation de gomme sans diminuer le pouvoir d'adsorption des globules.

*Première expérience.* — a) On fait usage d'émulsions vaccinales au 1/5 qui ont été préparées trois semaines avant, chaque vaccin est expérimenté sur 12 cobayes répartis en quatre groupes de 3 ; on vaccine en deux temps, à trois semaines d'intervalle aux doses de 0,25, 0,50, 1, 2 cm<sup>3</sup> chaque fois. L'épreuve consiste en une inoculation de 0,02 g. de virus des rues dans les masseters ; elle est pratiquée un mois et demi après la deuxième vaccination ; elle donne les résultats suivants : cobayes qui ont reçu le vaccin additionné de latex, 1 mort sur 12 ; cobayes qui ont reçu le vaccin sans latex, 8 morts sur 12 ; cobayes témoins non vaccinés, 4 morts sur 4.

b) Les mêmes émulsions sont employées à nouveau un an plus tard ; elles ont été conservées à la température de 6° C. Le protocole expérimental est le même ; l'épreuve pratiquée trois semaines après la deuxième vaccination donne les résultats suivants : cobayes qui ont reçu le vaccin additionné de latex, 1 mort sur 12 ; cobayes qui ont reçu le vaccin sans latex, 6 morts sur 12 ; cobayes témoins non vaccinés, 4 morts sur 4.

(1) *C. R. Acad. Sci.*, 1947, 224, 1390.

(2) H. JACOTOT, ces *Annales*, 1947, 73, 1028.

*Deuxième expérience.* — On fait usage d'émulsions vaccinales préparées un mois et demi avant ; le protocole expérimental est identique au précédent mais l'épreuve est pratiquée un mois seulement après la deuxième vaccination ; elle donne les résultats suivants : cobayes qui ont reçu le vaccin additionné de latex, 1 mort sur 12 ; cobayes qui ont reçu le vaccin sans latex, 7 morts sur 12 ; cobayes témoins non vaccinés, 3 morts sur 3.

*Troisième expérience.* — On fait usage d'émulsions vaccinales au 1/5 qui ont été préparées quinze jours avant ; le protocole n'est pas modifié ; l'épreuve virulente pratiquée un mois après la deuxième vaccination donne les résultats suivants : cobayes qui ont reçu le vaccin additionné de latex, 2 morts sur 12 ; cobayes qui ont reçu le vaccin sans latex, 6 morts sur 12 ; cobayes témoins non vaccinés, 4 morts sur 4.

*Quatrième expérience.* — On fait usage d'émulsions vaccinales au 1/10 préparées trois semaines avant. Chaque vaccin est expérimenté sur 9 cobayes répartis en trois groupes de 3 ; on vaccine en deux temps aux doses de 0,50, 1, 2 cm<sup>3</sup>. L'épreuve virulente pratiquée sept semaines après la deuxième vaccination donne les résultats suivants : cobayes qui ont reçu le vaccin additionné de latex, 4 morts sur 9 ; cobayes qui ont reçu le vaccin sans latex, 7 morts sur 9 ; cobayes témoins non vaccinés, 4 morts sur 4.

**CONCLUSION.** — L'addition d'une petite quantité de latex d'*Hevea brasiliensis* au vaccin antirabique constitué par la pulpe formolée d'encéphales rabiques, augmente de façon appréciable l'activité de ce vaccin ; la totalisation des résultats fournis par les expériences rapportées ici montre que 9 seulement des 57 cobayes qui avaient reçu le vaccin additionné de latex ont succombé à l'épreuve virulente contre 34 des 57 cobayes qui avaient reçu le vaccin sans latex ; en d'autres termes, 84 p. 100 des cobayes du premier groupe (vaccin au latex) ont résisté à l'épreuve et 40 p. 100 seulement des cobayes du deuxième groupe (vaccin sans latex). Tous les cobayes témoins non vaccinés, soit 19, sont morts.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux que l'on obtient lorsqu'on emploie comme adjuvant du même vaccin antirabique l'alumine hydratée en gelée (3).

(*Institut Pasteur de Nhatrang, Indochine.*)

## SUR UN GERME DU GENRE *LISTERIA* APPAREMMENT NON PATHOGÈNE

par R. SOHIER, F. BENAZET et M. PIECHAUD.

En 1941, au cours de recherches sur le mécanisme de la réaction d'agglutination de Paul-Bunnell-Davidson, nous avons isolé d'un sang de bœuf cuit un germe ayant de nombreux caractères communs avec

(3) H. JACOTOT, *Ces Annales*, 1947, **73**, 1028.

*Listeria monocytogenes*, mais n'en ayant pas les propriétés pathogènes.

Certains problèmes relatifs aux *Listeria* n'étant pas encore entièrement résolus, nous croyons devoir rapporter les résultats de nos constatations.

Dans cette étude, qui ne peut être développée ici, nous rappellerons les caractères qui rapprochent, mais aussi distinguent ce germe (étiqueté L<sup>26</sup> dans notre collection) des *Listeria*.

C'est un petit bacille très mobile, à bouts arrondis, se présentant dans les cultures isolément, ou groupé par deux, ou en files plus ou moins longues et gardant le Gram. Il se développe aisément sur les milieux ordinaires, mais plus richement sur ceux contenant du sang ou du glucose.

On peut observer sur milieu solide des colonies lisses, convexes, correspondant à des formes « Smooth » et constituées presque exclusivement de petits bâtonnets, alors que d'autres colonies à centre un peu déprimé et à bords dentelés sont constituées par des formes longues, filamenteuses et parfois en Y (forme « Rough »); on note aussi des aspects diphtéroïdes.

Il fermente : lactose (lentement trois à quatre jours), glucose, saccharose, lévulose, maltose, glycérine, mais n'attaque pas la dulcite, la mannite. Il provoque un léger virage du lait tournesolé. Il ne produit pas d'indol et pas d'H<sub>2</sub>S. Comme les *Listeria* (voir note suivante), la souche L<sup>26</sup> noircit le milieu à l'esculine-citrate de fer.

Quelques caractères morphologiques et culturaux du germe L<sup>26</sup> sont différents de ceux que nous avons observés sur les différentes souches de *Listeria* que nous avons étudiées : ce sont, en particulier, une mobilité très grande, aussi bien à 37° qu'à la température du laboratoire, l'apparition d'une teinte jaune des colonies après quelques jours, l'absence de pouvoir hémolytique en milieu solide alors qu'il est faible en milieu liquide.

Mais les différences les plus nettes sont celles relatives au pouvoir pathogène. En effet, jamais l'instillation oculaire, même de suspensions denses de L<sup>26</sup> n'a provoqué de réaction inflammatoire et n'a permis de reproduire le test si caractéristique dit de Pons et Julianelle.

Si, peu de temps après son isolement, l'injection intrapéritonéale de suspensions de cultures de vingt-quatre heures de type « Smooth » a provoqué en six jours la mort de 2 rats, et si une souris inoculée par voie nasale avec le germe isolé du sang du cœur d'un des rats, a succombé en cinq jours, par la suite nous n'avons pu obtenir à nouveau ces résultats. Même l'injection intrapéritonéale de germes en suspension dans la mucine, a été sans action pour les rats et les souris. Trois lapins ont résisté à des injections intraveineuses de doses variées, dont certaines élevées, de cultures, et n'ont présenté qu'une légère monocytose.

L'étude immunologique de la souche L<sup>26</sup> a été faite *in vitro* et *in vivo*. Les sérum de 2 lapins immunisés avec la souche L<sup>26</sup> n'ont pas agglutiné les suspensions de *Listeria* (souche Inst Pasteur de Paris, souche Harvier, souche *E. monocytogenes* de l'Institut Lister), alors qu'ils agglutinaient respectivement au 1/1.600 et au 1/3.200 la souche homologue. A l'inverse, les sérum anti-*Listeria*, préparés avec les souches précédentes, n'agglutinaient pas la souche L<sup>26</sup>. Mais on connaît l'existence de plusieurs types antigéniques de *Listeria* et nous n'avons pu les obtenir tous.

Il a été procédé à l'immunisation de 12 souris, au moyen de 4 injections sous-cutanées de 0,5 cm<sup>3</sup> de culture en bouillon de L<sup>26</sup> (à dix jours d'intervalle, puis trente jours pour la dernière). Ces souris ont été réparties en quatre lots qui ont reçu respectivement une suspension de trois *Listeria* (souche Coton, Forgeot, Belin) et une suspension d'*Erysipelothrix rhusiopathiae*. Chaque lot comprenait des témoins. Il n'y a pas eu de différence

notable de comportement entre les souris témoins ajoutées à chaque lot et celles ayant précédemment reçu des injections de la souche L<sup>26</sup>.

De nombreuses autres recherches ont été effectuées. Celles relatives au mécanisme de la réaction d'agglutination ont été rapportées précédemment (1,2) et ne peuvent être résumées ici, mais nous rappellerons que L<sup>26</sup> a été trouvée dans un des rares sanguins de bœuf qui, après chauffage à 100°, provoquaient par injection intraveineuse au lapin l'apparition d'agglutinines anti-mouton du type de celles observées dans la mononucléose infectieuse. On devait admettre que la *Listeria* se trouvait dans le sang du bœuf au moment des prélèvements à l'abattoir. Des essais effectués pour expliquer la présence du germe dans la suspension de globules de bœuf bouillis, il ressort que dans certaines conditions et en particulier lorsqu'il se trouve inclus dans un caillot coagulé, le germe peut résister à une température élevée qui se trouve d'ailleurs être, selon toute vraisemblance, inférieure à celle notée dans le bain-marie (100°), où plongent les ballons.

Un fait analogue a été signalé pour divers germes contaminant les viandes et qui, placés au centre des quartiers, résistent à des cuissages prolongés. D'autres contrôles méritent d'être effectués avec les *Listeria* pathogènes dont le mécanisme de transmission à l'homme est encore imprécis.

*En résumé* : Nous avons isolé d'un sang de bœuf cuit, dans lequel il avait paru résister, un germe (L<sup>26</sup>) qui a de nombreux caractères communs (morphologiques, culturaux, métaboliques et biologiques) avec les *Listeria*, mais dont le pouvoir pathogène faible peu après son isolement est demeuré ultérieurement nul pour les animaux sensibles. Les réactions d'agglutination auxquelles il a été procédé n'ont pas révélé de rapports antigéniques avec les *Listeria* dont nous disposons. Les souris vaccinées avec la souche L<sup>26</sup> n'ont pas été immunisées contre les souches pathogènes. Nous n'avons pas connaissance que l'existence de germes du type de celui dont nous avons rapporté les caractères ait été signalée (3). Il paraît possible de le classer, du moins jusqu'à plus ample informé, dans le genre *Listeria* (4).

**M. Forgeot** : L'expression « sang cuit », utilisée par les auteurs nous paraît mauvaise, car elle n'indique pas la température exacte du chauffage, ni sa durée. Nous apprenons qu'il s'agit de ballons de sang de bœuf (quelle contenance ?) placés au bain-marie à 100°, mais il n'est pas indiqué pen-

(1) F. BENAZET, Recherches sur le rôle des *Listerella* dans la mononucléose infectieuse. *Thèse Lyon*, 1943.

(2) R. SOHN et M. TISSIER, Recherches expérimentales sur le mécanisme et la signification de la réaction d'agglutination de Paul-Bunnell-Davidsohn. *Rev. Immunol.*, 1946, **10**, 211.

(3) Peut-être doit-il être rapproché de la souche isolée par Broll en 1911, du sang putréfié d'un bœuf ayant succombé à une infection de nature indéterminée, car il était très peu pathogène.

(4) Nous remercions beaucoup M. le professeur Dumas qui a bien voulu confirmer les caractères que nous avions mis en évidence pour la souche L<sup>26</sup>. Nos remerciements vont aussi à Mr S. T. Cowan, Curator de l'Institut Lister, qui a procédé également à une étude de cette souche et a admis qu'elle semblait voisine des *Listeria*.

dant combien de temps. Ce sang a été recueilli à l'abattoir (avec ou sans précautions spéciales d'asepsie?). Les auteurs disent : « Lorsqu'il se trouve inclus dans un caillot coagulé, le germe peut résister à une température élevée ». Il aurait été intéressant de voir si, après isolement et culture, ce germe, placé dans du sang de bœuf chauffé à la même température, conservait sa vitalité ; la majorité des auteurs indiquent en effet qu'après un chauffage d'une heure à 55° le germe est tué. La question est d'importance, si on se place au point de vue du consommateur.

**M. R. Sohier** : Les ballons dans lesquels étaient préparés les globules de bœuf cuits pour la réaction de Paul-Bunnell-Davidsohn avaient un volume de 300 cm<sup>3</sup> et contenaient 25 cm<sup>3</sup> de sang et 100 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. Ils étaient mis au bain-marie à 100° une heure. Le sang de bœuf était recueilli à l'abattoir au moment de la saignée, aussi proprement que possible, mais sans asepsie véritable. Il nous a paru vraisemblable d'admettre (toutes autres hypothèses plausibles éliminées) que le germe provenait du sang de bœuf. Mais, surpris qu'il ait pu résister au chauffage, nous avons tenté quelques essais. A plusieurs reprises des cultures ont été mêlées à du sang de bœuf stérile qui était utilisé pour la préparation de l'antigène dans des conditions normales : le germe n'a pas été retrouvé après passage au bain-marie à 100° une heure. Mais lorsqu'on mêlait les cultures à du sang et qu'on obtenait la coagulation à 80° ou 100° pendant une à trois minutes, puis qu'après refroidissement on chauffait à nouveau le sang à 80° et 100° au bain-marie dans des ballons de 300 cm<sup>3</sup> et sans dissocier les caillots, on pouvait retrouver la *Listeria* L<sup>26</sup> après trente et une fois quarante-cinq minutes.

Ces circonstances ont pu être réalisées fortuitement au cours de la préparation des antigènes, car l'aide qui en était chargée et qui, à l'époque, manipulait 15 à 20 antigènes par séance, a pu, gênée qu'elle était par des questions matérielles, opérer en deux temps, comme cela lui était arrivé. C'est du moins l'hypothèse que nous proposons en posant, sans la résoudre, la question de la persistance possible de *Listeria* dans des produits d'origine commerciale malgré la cuisson.

## COMPORTEMENT DIFFÉRENT DES *ERYSIPLOTHRIX* ET DES *LISTERIA* SUR MILIEU DE CULTURE A L'ESCULINE

par R. SOHIER.

Si l'on admet aujourd'hui que les *Listeria* doivent être nettement distinguées des *Erysipelothrix* (1), certains rapprochements ont été faits entre ces deux espèces, initialement semble-t-il par Topley et Wilson (1936), puis par d'autres auteurs qui ont été jusqu'à envisager leur classement dans le même genre bactérien.

(1) On a proposé de classer les *Listeria* dans la famille des *Bacteriaceæ*, tribu des *Kurthiæ*, et les *Erysipelothrix* dans celle des *Actinomycetaceæ* genre *Erysipelothrix*. Récemment Prévot a adopté une classification voisine. *Listeria Pirie* genre VI de la famille des *Bacteriaceæ*, *Erysipelothrix Rosenbach* genre VI de la famille des *Actinomycetaceæ*.

C'est qu'en effet on observe d'assez nombreuses ressemblances relatives à la morphologie des germes, à l'aspect des colonies, aux caractères culturaux et métaboliques. Elles ont justifié l'importante étude de Mary Barber (2), dans laquelle les éléments de discrimination ont été recherchés systématiquement. Ce serait essentiellement : l'absence de parenté antigénique, le pouvoir pathogène expérimental différent, en particulier sur le cobaye et le pigeon. On pouvait penser en outre que la recherche de la mobilité (3) devait permettre de distinguer rapidement les *Erysipelothrix* des *Listeria*. Mais il arrive que ces derniers paraissent immobiles après développement à 37°, alors que les mouvements sont nets si le germe a été cultivé à 22°, 25°, d'où une possibilité d'erreur, du moins à un moment où l'on n'a pas effectué l'étude immunologique et celle du pouvoir pathogène.

Comme ces dernières demandent un certain temps, des sérums spécifiques ainsi que des animaux dont tous les laboratoires ne peuvent toujours disposer, nous avons cru de quelque intérêt de rapporter les résultats de l'étude comparée du comportement des *Erysipelothrix* et des *Listeria* sur milieu à l'esculine-citrate de fer.

Au cours d'une étude sur les *Listeria* faite à propos d'un germe dont les caractères ont été précédemment étudiés, nous avons constaté, en effet, que les *Erysipelothrix* ne modifiaient pas le milieu tandis que les *Listeria* le noircissent (4, 5). Lorsque l'ensemencement est fait en déposant quelques gouttes de culture liquide sur un culot du milieu à l'esculine et en traçant quelques stries entre celui-ci et la paroi du tube, et si l'on a soin de mettre le tube dans une cuve d'eau à 37° placée dans une étuve à la même température, le noircissement se produit habituellement en trois à quatre heures.

Nous avons procédé à cette recherche avec les souches d'*Erysipelothrix* suivantes : 8 souches provenant du Laboratoire du professeur Legroux, à l'Institut Pasteur de Paris, et étiquetées « Petit », « Rijnard », « Grignon », « Mouton », « Toulouse », « Aynaud » 666, 679 et 740. Une souche A 333, provenant de l'Institut de Bactériologie de Lausanne (professeur

(2) M. BARBER, *J. Path. a. Bact.*, 1939, 48, 11.

(3) Nous avons cherché à mettre en évidence cette mobilité en utilisant un milieu du type de celui proposé par Tissler et Sandholzer, et employé en particulier pour le diagnostic des Entérobactéries. Après seize à vingt heures à 37°, toutes les *Listeria* ont donné un résultat positif sauf l'une d'entre elles (L H) qui au microscope se révélait non mobile à 37° mais l'était à 22°. Elle a donné en milieu de mobilité un résultat nettement positif dans le tube laissé à 22° et très légèrement positif à 37°. Il y a donc eu une concordance parfaite. On pourra en tenir compte dans la pratique.

(4) On sait que certains germes dédoublent l'esculine en glucose et esculetine. L'esculetine donne avec le citrate de fer une réaction aboutissant au noircissement du milieu. Ce phénomène vu par Harrison et Van der Leck pour le colibacille a été étudié très complètement par Rochaix et Sarda. On trouvera tous les détails de ces recherches dans la Thèse de Sarda, Lyon, 1947, Editions du Service photographique de l'Université.

(5) Nous avons eu connaissance, postérieurement à nos essais, de ce que M. Cotonni avait observé le dédoublement de l'esculine par une *Listeria* identifiée longtemps après son isolement. Cette constatation initiale mérite d'être signalée (voir ci-dessous : Remarque de M. Cotonni).

Hauduroy). Deux souches isolées par M. Paille, à l'Institut Merieux, soit au total 11, dont aucune n'a modifié le milieu.

En ce qui concerne les *Listeria*, 3 souches ont été ensemencées par nous : une (L P) provenant de la collection du professeur Legroux ; une (L H) nous avait été obligamment remise par M. Lavergne (elle avait été isolée chez un homme atteint de méningite : cas Harvier, Lavergne et Claisse) ; une nous avait été envoyée par l'Institut Lister (étiquetée *Erysipelothrix monocytogenes* 2166). Elles ont toutes provoqué le noircissement du milieu. M. Piéchaud a bien voulu nous communiquer le résultat de constatations identiques faites sur 3 autres souches étudiées au laboratoire du professeur Dumas, soit au total 6 *Listeria*.

La souche L 26, dont nous avons rappelé les caractères (voir note précédente) a également noirci le milieu à l'esculine et cette constatation a contribué à nous faire classer cette bactérie dans le genre *Listeria*. Mais il convient de remarquer que le noircissement était relativement lent (début partiel après cinq à six heures et noircissement total à la vingt-quatrième heure seulement), alors que les *Listeria* pathogènes donnent une teinte noire intense et totale en quelques heures. On peut se demander s'il y a un parallélisme entre l'intensité du noircissement et le pouvoir pathogène.

*En résumé.* — Nous avons constaté que 11 souches d'*Erysipelothrix rhusiopathiae* (ou *Rosenbach*) n'ont pas modifié le milieu de culture à l'esculine-citrate de fer sur lequel elles étaient ensemencées, alors qu'il a pris rapidement une teinte noire intense après culture de 7 souches de *Listeria*.

Si de nouveaux contrôles confirment ces premières observations, un nouvel élément de différenciation s'ajoutera aux caractères qui permettent de distinguer ces deux genres bactériens et fournira une méthode simple et rapide de diagnostic bactériologique.

**M. Coton :** M. Sohier insiste à juste titre sur les difficultés signalées déjà par Barber (1939), à propos du diagnostic différentiel des *Erysipelothrix* et des *Listeria*. Rappelons que le même problème s'est posé dès l'origine. Un échantillon microbien *Listeria* « avant la lettre », avait été trouvé dès 1919 par notre regretté collègue, le Docteur J. Dumont, dans un liquide céphalo-rachidien de méningitique et étudié par nous-même, en 1921, sous le titre : « Bacille semblable au bacille du rouget du porc, rencontré dans le liquide céphalo-rachidien d'un méningitique » (1). Reprenant, plus de vingt ans après, l'étude du même échantillon (2), conservé *in vitro*, nous pouvions affirmer sa mobilité, méconnue lors de l'isolement et l'identifier aux germes décrits entre nos deux publications par Murray, Webb et Swann en 1926 sous le nom de *Bacterium monocytogenes* et par Pirie, en 1927 sous les noms successifs de *Listerella hepatica* et *Listerella monocytogenes*. Dans l'étude des caractères de notre échantillon (1941), figurait aussi le *dédoubllement de l'esculine*, auquel M. Sohier attache une certaine importance pour différencier les *Listeria*, suivant la dénomination actuelle.

(1) J. DUMONT et L. COTONI, ces *Annales*, 1921, 35, 625.

(2) L. COTONI, ces *Annales*, 1942, 68, 92.

## APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE ROBINOW A LA COLORATION DES SPORES BACTÉRIENNES

par RAYNAUD et P. ANDRÉ.

L'existence d'un noyau chez les bactéries est restée longtemps douteuse malgré de nombreuses recherches. Les images publiées manquaient de netteté, en raison d'une part de l'exiguité de la cellule bactérienne et d'autre part de l'imperfection des méthodes de coloration. Robinow (1) a perfectionné certaines techniques employées antérieurement et a obtenu des images très démonstratives qui établissent l'existence chez les bactéries d'un organite analogue au noyau des cellules des organismes supérieurs. La technique de Robinow consiste à colorer au Giemsa les bactéries préalablement soumises à l'hydrolyse par une solution d'HCl  $\frac{N}{4}$  à 60° pendant dix minutes.

D'après Vendrely et Mlle Lipardy (2) l'hydrolyse chlorhydrique a pour effet d'éliminer les ribonucléoprotéines cytoplasmiques tout en respectant les désoxyribonucléoprotéines du noyau. Sur cette base, Tulasne et Vendrely (3) ont décrit une nouvelle méthode de coloration du noyau ou l'hydrolyse chlorhydrique préalable est remplacée par une hydrolyse enzymatique par la ribonucléase. Il faut d'ailleurs remarquer avec ces auteurs et avec Peshkoff (3 bis) que si les noyaux ne sont visibles sur les cellules jeunes qu'après hydrolyse acide ou enzymatique préalable, sur les cellules bactériennes plus âgées le noyau est souvent visible sans hydrolyse. L'interprétation des images obtenues par coloration directe au Giemsa sans hydrolyse préalable est cependant toujours délicate, en particulier chez les bactéries qui présentent des granulations métachromatiques. [Ces dernières seraient constituées d'après Wiame (4) et Lindegren (5) par de l'acide métaphosphorique polymérisé en combinaison organique, et non par des acides nucléiques].

Quelle que soit l'interprétation chimique de la méthode de Robinow, elle permet de mettre en évidence les formations nucléaires des bactéries. Robinow a publié de très belles photographies de noyaux à l'intérieur des spores bactériennes. Nous avons pensé utiliser sa technique pour la mise en évidence systématique des spores chez les bactéries. On sait en effet que dans le système de classification de A. R. Prévot (6)

(1) ROBINOW, *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 1942, **430**, 299; *J. Hyg.*, 1943, **43**, 413; *Addendum au livre de R. DUBOS, The Bacterial Cell* (1944).

(2) VENDRELY et Mlle LIPARDY, *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 342.

(3) TULASNE et VENDRELY, *Nature*, 1947, **160**, 225.

(3 bis) PESHKOFF, *Am. Rev. Sov. Med.*, 1945, **2**, 342.

(4) WIAME, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 552.

(5) LINDEGREN, *Nature*, 1947, **159**, 63.

(6) A. R. PRÉVOT, *Manuel de Classification des bactéries anaérobies*, Masson, édit., 1940.

la position de la spore joue un rôle important. Il est donc très utile de pouvoir reconnaître cette dernière sans ambiguïté sur les préparations.

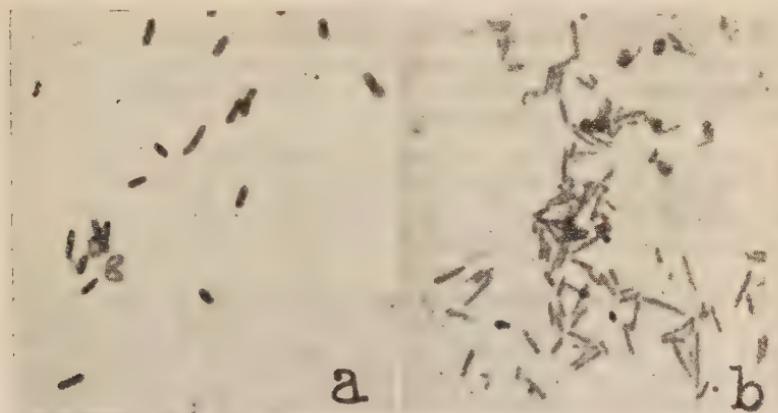


FIG. 1. — Spores libres de *Cl. sporogenes*. a) Colorées directement au Giemsa.  
b) Colorées par la technique de Robinow.

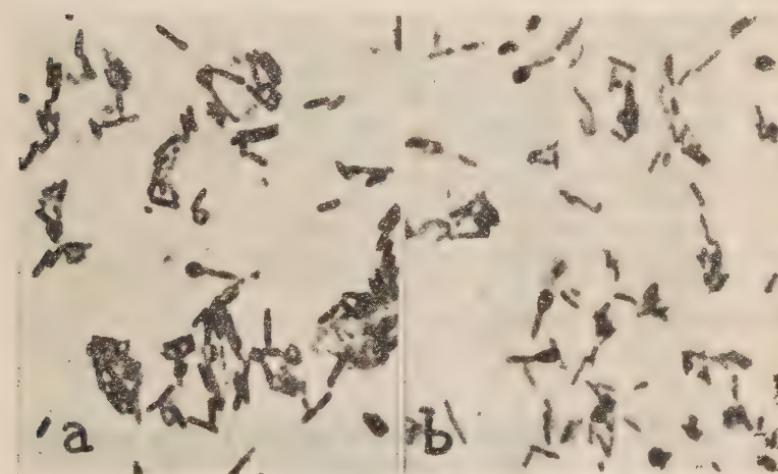


FIG. 2. — Spores libres et spores intrabacillaires terminales de *Plectridium tetani*. a) colorées directement au Giemsa; b) colorées par la technique de Robinow.

Nous avons apporté quelques modifications de détail à la technique de Robinow. Les bactéries sont étalées de façon ordinaire si on a à faire à une culture en milieu solide. Pour les cultures en bouillon, il est préférable de centrifuger préalablement et d'effectuer l'étalement avec le culot. On peut fixer, soit à l'alcool, soit aux vapours d'acide

osmique, soit au liquide de Chabaud (7) recommandé par Tulasne et Vendrely (8). On fait toujours 2 lames : l'une est colorée directement, l'autre après séjour pendant dix minutes dans un bain d'HCl  $\frac{N}{4}$  à 60°. La coloration peut être faite au Giemsa habituel. Nous avons préféré, pour des raisons d'économie, employer une solution préparée temporairement, d'après la technique initiale de Giemsa (8). Le bain colorant a la composition suivante :

Solution aqueuse de bleu azur II de méthylène à 0,20 p. 100.	15 cm <sup>3</sup>
Solution aqueuse d'éosine (ou mieux d'érythrosine) à 0,10 p. 100 . . . . .	15 cm <sup>3</sup>
Tampon phosphate $\frac{M}{40}$ de pH = 7 . . . . .	70 cm <sup>3</sup>

On peut préparer des volumes importants de ce colorant, qui est bon marché, et effectuer la coloration dans des cuves à rainures, les lames étant placées verticalement. On évite ainsi la formation de précipité. On laisse trente à quarante-cinq minutes et on lave. Le bain colorant ne se conserve pas au delà de douze heures.

Appliquée à diverses espèces bactériennes, en particulier à *Sphaerophorus funduliformis*, cette technique nous a permis de mettre en évidence leurs fonctions nucléaires. Chez les anaérobies des genres *Clostridium* et *Plectridium*, nous avons pu colorer ainsi les spores de façon très simple.

Alors que la spore, sur les préparations non hydrolysées, ne se laisse apercevoir que par son contour déformant le bacille ou par son épiplasme coloré, après hydrolyse elle apparaît entièrement colorée sur le fond pâle du corps bactérien. Par ailleurs, on ne reconnaît avec certitude, sur une préparation ordinaire, que les spores déjà assez âgées qui déforment le corps bacillaire. Tandis qu'avec la technique de Robinow, les spores sont visibles même au début de leur formation à l'intérieur du bacille, si bien que le nombre des bactéries sporulées, sur une préparation donnée, paraît beaucoup plus élevé, ce qui facilite leur recherche.

(Institut Pasteur. Laboratoire des Anaérobies. Service du Dr PRÉVOT.)

## NOTE SUR LE POUVOIR AMMONIFIANT DES SABLES DE LA CAMARGUE

par R. CHALAUST.

Dans le cadre d'une étude sur les caractères de la microflore des sols de la Camargue et sur les grandes fonctions géo-biologiques qui en dépendent : fixation d'azote, ammonification, nitrification, cellulolyse,

(7) CHABAUD, ces Annales, 1942, 68, 106.

(8) GIEMSA, Zentralbl. Bakter., 1902, 31, 420 ; 1902, 32, 307.

nous avons étudié ici le cas particulier de l'ammonification, c'est-à-dire la transformation progressive des matières organiques azotées en ammoniac par la flore totale du sol.

Nous avons effectué ce travail sur 7 échantillons de sable éolien de Camargue ; ceux-ci ont pour origine un remaniement, par le vent, du limon fondamental.

Ces échantillons de sable calcaire ont été prélevés dans la région d'Aigues-Morte, Le Grau du Roy, et proviennent de terrains placés dans des conditions écologiques variées :

Des sables de vignobles n'ayant subi aucun amendement depuis 1940, sable de forêts de pins, sable de terrain inculte du bord de la mer, sur lequel ne poussent que quelques plantes xérophytées, sable de terrains situés au-dessous du niveau de la mer et périodiquement immergés.

Le fait que ces terrains n'ont reçu aucun amendement, depuis 1940 au moins, crée des conditions très favorables pour cette étude.

Sur ces 7 échantillons, nous avons dosé :

1<sup>o</sup> Le calcaire, sous forme de CaO par précipitation à l'oxalate d'ammonium et calcination;

2<sup>o</sup> Le phosphore assimilable sous forme de  $P_2O_5$  par la méthode de Schloesing de Sigmund;

3<sup>o</sup> L'azote, par la méthode Kjeldahl;

4<sup>o</sup> Le chlore, par l'épuisement de l'échantillon à l'eau et titrage du filtrat par le nitrate d'argent en présence de chromate de potassium;

5<sup>o</sup> Dosage du carbone par la méthode Nardo (1);

6<sup>o</sup> Le dosage de l'humus par la méthode d'oxydation permanganique.

		NUMÉRO	Cl p. 1.000	N p. 1.000	HUMUS p. 1.000	$P_2O_5$ p. 1.000	CaO p. 1.000	C p. 1.000
Sables de vignobles.	Près d'Aigues-Mortes	4	0,053	0,79	3,36	4,095	152	8,2
		5	0,030	1,00	3,00	4,07	173	44
	Domaine des Sablons.	3	0,012	0,39	1,35	4,92	158	5,4
Sable de forêt.	Le Grau-du-Roy . .	7	0,011	0,27	0	1,03	476,5	7,5
	Domaine des Sablons.	4	0,047	0,70	2,30	0,492	135	11
Sable du bord de la mer.	Le Grau-du-Roy . .	6	0,020	0,52	0	0,73	182	4,38
	Le Grau-du-Roy près du « Sémaphore » .	9	3,49	0,40	0	6,555	142	7

Nous constatons, d'après ce tableau, que le substrat minéral de ces sols est à peu près le même pour tous les échantillons, mais qu'ils diffèrent sensiblement par leur teneur en humus et en azote, c'est-

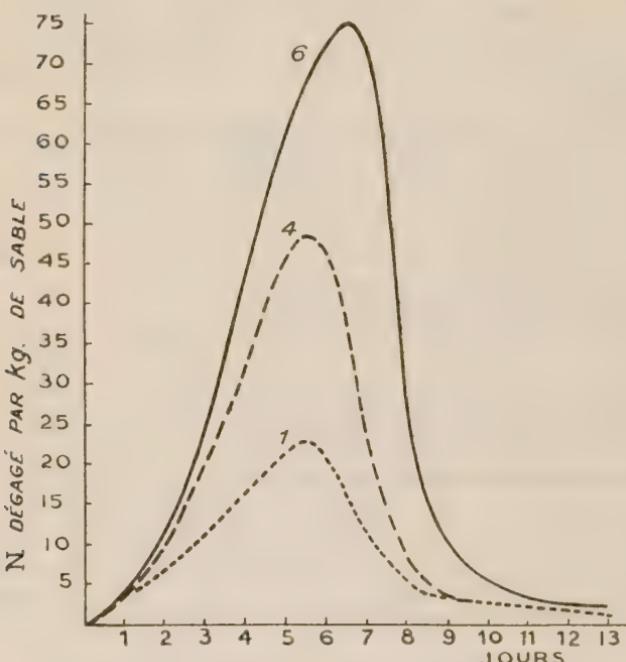
(1) V. NARDO, *Ann. agr.*, 1939, 9.

à-dire qu'il s'agit de terrains à des stades variés de leur évolution géobiologique.

Nous avons choisi, pour étudier l'ammonification, la technique de Pochon et Tchan (2) en employant comme substance azotée la poudre de sang, à la concentration de 4 p. 1.000.

L'ammoniac dégagé est capté par de l'acide sulfurique N/50 et titré en retour par NaOH N/50 en présence d'alizarine sulfonate de soude.

Le dosage de l'ammoniac dégagé est effectué toutes les vingt-quatre



heures et nous permet l'établissement des courbes de dégagement en fonction du temps.

La technique d'impression sur lame nous renseigne sur la diversité et l'évolution de la flore microbienne à chaque point des courbes d'ammonification.

L'examen de l'ensemble des résultats (voir le tableau ci-contre) montre de façon évidente que:

1<sup>o</sup> La quantité totale d'ammoniac dégagé est d'autant plus grande que la teneur en humus est plus faible.

2<sup>o</sup> La marche du dégagement d'ammoniac est sensiblement identique dans tous les essais. (Voir courbes).

3<sup>o</sup> La teneur en sel des échantillons n'influence pas le processus

(2) POCHON et TCHAN, ces Annales, 1947, 73, 696.

	NUMÉRO	HUMUS p. 1.000	NH <sub>3</sub> TOTAL dégagé Milligrammes par kilogramme de terre
Sable non salé . . . . .	1	3,36	140
	5	3,00	124
	4	2,30	278
	3	1,35	339
	6	0	399
	7	0	406
Sable salé . . . . .	9	0	440

d'ammonification; les terrains périodiquement immersés ayant une teneur en humus nulle ou très faible, dégagent, en présence de poudre de sang, une quantité d'ammoniac à peu près égale à celle que donnerait dans des conditions identiques un échantillon de sable non salé.

4<sup>o</sup> Pour ces 7 échantillons, il n'y a pas de rapport apparent entre l'ammonification et la flore de surface.

5<sup>o</sup> L'examen des lames colorées (technique d'impression sur lame) permettant de suivre l'évolution de la micro-flore au cours de l'ammonification, montre, pour les sables peu humifiés, une micro-flore peu variée, mais abondante, alors que celle-ci est beaucoup plus variée pour les sables humifiés.

D'une façon générale, nous avons remarqué, au cours de l'évolution de la micro-flore ammonifiante, une forte prédominance des formes en coccus et en bâtonnets courts groupés en colonies nombreuses.

Par contre, les champignons sont rares, sauf dans le cas du sable salé où ils apparaissent vers le dixième jour.

Le fait que nous retrouvons dans le cas de sables calcaires de la région méditerranéenne un dégagement d'ammoniac inversement proportionnel à la quantité d'humus, vient confirmer et compléter les observations identiques de Pochon, Tchan, Chalvignac et Chalaust (3) sur les processus d'ammonification dans différents sables siliceux plus ou moins humifiés de l'Oise. Il semble donc s'agir là d'une loi assez générale sur les rapports des processus d'ammonification et d'humification dans les terrains sableux.

#### CONCLUSIONS. — Nous conclurons en retenant que :

1<sup>o</sup> Le dégagement d'ammoniac au cours de l'ammonification dans les terrains sableux est d'autant plus accentué que la teneur en humus est plus faible;

2<sup>o</sup> Que la micro-flore ammonifiante existe aussi bien dans les sables peu humifiés que dans les sables très humifiés, mais qu'elle diffère au point de vue morphologique;

3<sup>o</sup> Que l'ammonification paraît indépendante de la flore dans les échantillons étudiés;

(3) POCHON, TCHAN, CHALVIGNAC et CHALAUST, ces *Annales*, 1947, 73, 1116

4<sup>o</sup> Que les sables salés ont un pouvoir ammonifiant identique aux sables non salés.

(*Laboratoire de Zoologie de l'E. N. S. [M. R. LEVY] et Institut Pasteur, annexe de Garches [M. POCHON].*)

## MÉTHODES DE TITRAGE DE LA PÉNICILLINASE

par FRANÇOISE GRUMBACH et FERNAND BOYER.

Au début de nos recherches sur la pénicillinase, nous avons employé la méthode classique des dilutions. On prépare des tubes contenant 5 cm<sup>3</sup> de milieu de culture et des quantités variables de pénicilline; on ajoute une quantité fixe de pénicillinase; on ensemence avec une goutte d'une culture de vingt-quatre heures de staphylocoque doré (dilution finale 10<sup>-4</sup>) et on lit les résultats au bout de vingt-quatre heures. Le dernier tube dans lequel pousse le staphylocoque indique le nombre d'unités de pénicilline qui ont été neutralisées par la quantité fixe de pénicillinase qu'on a introduite, 0,05 cm<sup>3</sup> (1). *Nous exprimons le titre de la pénicillinase par le nombre d'unités de pénicilline inactivées par 0,05 cm<sup>3</sup> de filtrat dans 5 cm<sup>3</sup> de milieu de culture* (2).

Ayant obtenu des pénicillinases d'un titre très élevé (jusqu'à 20.000 unités inactivées par 0,05 cm<sup>3</sup> de filtrat), il nous a fallu utiliser des quantités considérables de pénicilline pour nos titrages.

Nous avons cherché une méthode qui puisse nous donner ces mêmes indications en n'utilisant que de faibles quantités de pénicilline. Nous avons dilué les pénicillinases avant de les titrer, mais nous nous sommes rapidement rendu compte qu'il n'y avait aucune proportionnalité entre le chiffre de la dilution et la quantité de pénicilline inhibée. C'est pourquoi nous avons eu l'idée d'appliquer la méthode de diffusion dans la gélose, au titrage de la pénicillinase. Le principe de ce dosage est très simple : dans des boîtes de Petri, on mélange la pénicilline à la gélose, on ensemence avec du staphylocoque; celui-ci ne pousse pas. Si l'on met de la pénicillinase dans les cylindres, celle-ci diffuse, inactive la pénicilline, et le staphylocoque pousse autour des cylindres.

Nous procédons de la façon suivante :

On coule dans des boîtes de Petri 20 cm<sup>3</sup> de gélose à 15 p. 1.000, à laquelle on incorpore 2 unités de pénicilline (soit 0,1 U. O. par centimètre cube de gélose). Après solidification du milieu, on ensemence ces boîtes comme pour les dosages Heatley avec du staphylocoque doré et on dépose à la surface les petits cylindres. Dans ces cylindres, on met les pénicillinases à filtrer et on emploie comme étalon une pénicillinase de titre connu (titre déterminé par la méthode des dilutions). On met vingt-quatre heures à l'étuve à 37°. A l'inverse de la méthode

(1) Nous avons renoncé à employer les pipettes comple-gouttes pour les titrages de pénicillinase en raison des erreurs considérables qu'on obtenait; nous n'utilisons plus que les pipettes graduées à 0,01 cm<sup>3</sup>.

(2) Tous nos titrages ont été faits avec des filtrats de cultures de *B. subtilis Ungar*.

Heatley pour doser la pénicilline, on obtient, autour des petits cylindres, des zones circulaires très régulières de culture de staphylocoque, d'autant plus grandes que la pénicillinase est plus active, tandis que

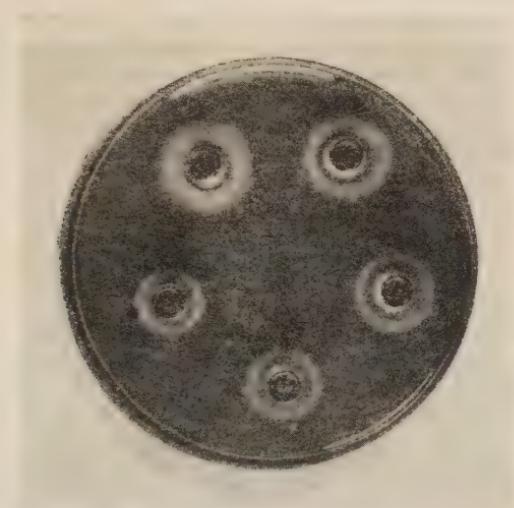


FIG. 1. — Titrage d'une pénicillinase. (Dilutions : 1, 1/2, 1/8, 1/10, 1/20.)

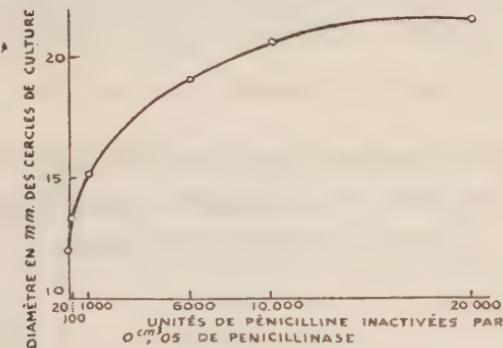


FIG. 2. — Courbe de titrage de la pénicillinase.

tout le reste de la boîte reste inhibé (fig. 1). La pénicilline contenue dans la gélose a inhibé le staphylocoque, tandis que la pénicillinase des cylindres a inactivé la pénicilline et permis au staphylocoque de se développer. *Le diamètre des cercles de culture permet d'apprécier le titre de la pénicillinase par rapport au diamètre des cercles de pénicillinas de titre connu.*

Nous avons pu établir une courbe avec des pénicillinases de titre connu allant de 100 à 20.000 unités. L'allure de la courbe (fig. 2) est

comparable à celle de la pénicilline, elle s'aplatit progressivement au-dessus de 10.000 unités, par conséquent elle n'est réellement et effectivement applicable qu'entre 0 et 10.000 unités ; c'est pourquoi, pour les pénicillinases de titre élevé, il est nécessaire de faire une gamme de dilutions (1/2, 1/5, 1/10) :

Comme nous l'indiquions précédemment, la nature vraisemblablement enzymatique de la pénicillinase fait que, par des dilutions, on n'obtient pas une action proportionnelle sur la pénicilline. Nous avons pu cependant, par des titrages comparatifs, établir un coefficient correspondant aux différentes dilutions, c'est ainsi que, en moyenne, pour une dilution au

1/2 il faut multiplier le titre par 3.  
 1/5 il faut multiplier le titre par 20.  
 1/10 il faut multiplier le titre par 400.  
 1/20 il faut multiplier le titre par 5.000.

On obtient ainsi, avec 2 unités seulement de pénicilline, le titre d'une pénicillinase, tandis qu'avec la méthode des dilutions, il nous fallait employer de 100 à 200.000 unités par titrage.

Un autre grand avantage de cette méthode, c'est de pouvoir titrer directement les milieux de culture contenant de la pénicillinase sans avoir besoin de les filtrer préalablement. Les germes ne diffusent pas dans la gélose et la zone de culture du staphylocoque est identique avec un même jus, filtré ou non (à condition toutefois que la filtration ait été faite dans de bonnes conditions et n'ait pas refoulé de pénicillinase).

Ceci permet de prélever fréquemment et à n'importe quel moment une très petite quantité de jus de culture et de le titrer immédiatement. On peut ainsi aisément suivre et contrôler la production de pénicillinase.

## RÉSULTATS D'UNE ENQUÊTE ÉPIDÉMIOLOGIQUE COMPORTANT PLUS DE 300 COPROCULTURES DANS LA RÉGION DE L'OUEST

par B. MAUPIN.

Dans le courant du mois de juin 1947, il nous a été demandé de procéder au dépistage de porteurs de germes intestinaux dans la 3<sup>e</sup> Région. En l'absence d'épidémie déclarée dans la collectivité militaire, cette enquête rentrait dans le cadre de mesures prophylactiques générales, motivées par l'approche de la saison chaude. Elle concernait les cuisiniers et serveurs de diverses formations et de toutes origines, groupant avec les militaires du territoire un important personnel civil, des Nord-Africains et de nombreux prisonniers allemands. Signalons tout de suite que nous n'avons pas observé de différences sensibles dans la flore intestinale suivant l'origine ethnique.

Les échantillons de selles, adressés par planton ou par voie postale,

étaient ensemencés immédiatement en milieu liquide d'enrichissement de Muller-Kaufmann. Isolément (après dix-huit heures d'étuve en moyenne) sur gélose au vert brillant de Kristensen. Identification des colonies suspectes par repiquage sur milieu de Hajna; puis épreuve à l'aide des sérums agglutinants polyvalents E A B C de l'Institut Pasteur. Eventuellement :

Galeries sucrées ;

Epreuves d'agglutination classique ;

Identification antigénique (ampoules aimablement adressées par le Service de M. Bonnefond).

Enfin, les sujets suspects ont fourni du sérum pour séro-réaction de Widal et séro-diagnostic qualitatif.

Au total, 315 selles ont été ainsi examinées, donnant 3 résultats positifs, tous trois chez des prisonniers allemands :

a) Souche 50 : Vol... Paratyphique B authentique, identifié sur lame, agglutiné au 1/51.200 par un sérum expérimental de collection.

Formule antigénique : I, IV-V; b — 1,2.

b) Souche 55 : Sch... Paratyphique B également typique, identifié sur lame, agglutiné au 1/25.600 par un sérum expérimental.

Formule antigénique : IV, V; b — 1,2.

c) Souche 10 : Dus... Paratyphique C. Germe identifié par agglutination sur lame. Caractères biochimiques voisins de ceux des paratyphiques B, avec production d'H<sup>2</sup>S.

Identification antigénique : réponse franche au sérum anti-VI-VII.

Le germe ayant pris très vite les caractères « R », n'a pu faire l'objet d'autres études. Nous croyons pouvoir le considérer comme un paratyphique vrai plutôt que comme un Kunzendorf.

Les données sérologiques sont résumées dans le tableau suivant :

	EO	EII	AO	AH	BO	BII	CO	CI
A. VOL... Qualitatif . Widal . . .	0 100	100 100	100 0	0 0	< 100 4.600	800 400	0 0	0 0
B. SCH... Qualitatif . Widal . . .	0 0	100 0	0 0	0 0	< 100 400	800 0	0 0	0 0
C. DUS... Qualitatif . Widal . . .	0 100	100 100	0 0	0 0	0 0	0 0	100 0	0 0

Vol... avait reçu en Août 1944 3 injections de vaccin anti typho-paratyphique et anticholérique allemand (doses : 0,5-1,0 et 1,0 cm<sup>3</sup>). Sch... avait reçu en octobre 1944, puis en novembre 1945, le même vaccin et les mêmes doses.

Nous n'avons pas de renseignement sur les vaccinations de Dus...

Ajoutons que le sérum de Vol... agglutinait son propre germe au 1/6.400, tandis que Sch... agglutinait son germe au 1/400.

Pour ces deux porteurs, nous regrettons de n'avoir pas pratiqué le séro-diagnostic BO à un taux inférieur au 1/100. Par contre, le taux des agglutinations H était très élevé. Il était permis de soupçonner

une infection récente. Or, voici l'histoire clinique, telle que les médecins de la formation nous l'ont fait connaître.

Les antécédents de Sch... étaient négatifs, en dehors d'un syndrome dyspeptique actuel.

Mais Vol... avait été soigné en mai 1947, soit le mois précédent l'enquête, à l'infirmerie de son camp, pour « maladie avec forte température, ayant duré quatre semaines : paratyphoïde probable ».

Quant à Dus..., il mentionne un épisode dysentérique non sanguant, indéterminé, en novembre 1942, près de Stalingrad.

Ces trois sujets furent éliminés des cuisines, et mis en observation dans un hôpital voisin de Rennes, pour y subir en principe un traitement par la sulfaguanidine. Entre le 15 et le 30 juillet, les coprocultures de contrôle furent négatives, pour Dus... à 4 reprises, pour Sch... à 2 reprises. Seul, Vol... demeura constamment porteur (9 examens positifs du 15 juillet au 1<sup>er</sup> septembre 1947).

Si l'enquêteur a eu la main heureuse, ce seul fait nous permet de conclure à l'utilité de telles enquêtes, appliquées systématiquement au personnel des cuisines. Elles seraient indiquées, notamment, au moment de l'embauchage, et pourraient être répétées périodiquement.

(Travail du Laboratoire Régional de Bactériologie Sacquépée, à Rennes, en liaison avec le service de M. BONNEFOL.)

## MISE EN ÉVIDENCE, DANS LE JAUNE D'ŒUF DE FACTEURS DE CROISSANCE POUR CERTAINS MICROBES

par J. SOLOMIDÈS.

Besredka et Jupille (1) ont déjà montré que le bouillon à l'œuf constituait un excellent milieu de culture et de conservation pour les microbes les plus divers dont le staphylocoque, le pneumocoque, le streptocoque, le colibacille et le bacille tuberculeux. Puis Besredka (2) et plus tard F. Van Deinse (3) ont établi que le jaune d'œuf dans l'eau distillée alcalinisée (milieu de Besredka) constituait un très bon milieu de culture pour le bacille tuberculeux. Nous nous sommes demandé si l'excellente valeur nutritive du jaune d'œuf pour divers microbes n'était pas due, tout au moins en partie, à des facteurs de croissance et nous nous sommes appliqué à les mettre en évidence pour un certain nombre de germes (staphylocoque, streptocoque, pneumocoque, colibacille, *Bacillus subtilis* et bacille tuberculeux).

A cet effet, deux types de bouillon ordinaire contenant 1/100 et 1/1.000 de milieu de Besredka, ce qui fait 1/2.000 et 1/20.000 de jaune

(1) BESREDKA et JUPILLE, ces *Annales*, 1913, 27, 1009.

(2) BESREDKA, ces *Annales*, 1921, 35, 291.

(3) F. VAN DEINSE, ces *Annales*, 1937, 59, 467.

d'œuf respectivement, ainsi que deux tubes témoins sans jaune d'œuf ont été ensemencés, chaque fois, avec des quantités très faibles d'incubum, variables avec les microbes étudiés. Les résultats ont été régulièrement enregistrés au bout de cinq à sept heures et de vingt à vingt-deux heures d'étuve. Nous n'avons tenu compte que des résultats nets observables à l'œil nu, ne nécessitant pas l'emploi de méthodes turbidimétriques.

Pour le staphylocoque, les meilleurs résultats ont été obtenus avec des cultures de vingt-quatre heures diluées dans le bouillon ordinaire à 1/500 et réparties à raison de 0,1 cm<sup>3</sup> par tube de milieu de culture. On observe, dans ces conditions, au bout de sept heures environ, un début de développement dans le bouillon contenant 1/2.000 de jaune d'œuf, alors que le bouillon ordinaire contenant 1/20.000 de jaune d'œuf, ainsi que les deux tubes témoins sans jaune d'œuf restent clairs. A la vingt-deuxième heure, le développement est abondant dans le bouillon à 1/2.000 de jaune d'œuf, nul ou faible dans le tube contenant 1/20.000 de ce corps et toujours nul dans les deux témoins sans jaune d'œuf.

En ce qui concerne le pneumocoque et le streptocoque, nous avons entrepris les mêmes expériences avec des cultures de ces germes en bouillon ordinaire, âgées de vingt-quatre heures. En ensemencant 0,1 cm<sup>3</sup> de ces cultures dans 4 tubes de bouillon ordinaire (2 à jaune d'œuf et 2 témoins sans jaune d'œuf) on constate, au bout de vingt-deux heures, que les tubes contenant du jaune d'œuf (1/2.000 et 1/20.000) sont franchement troubles, alors que les tubes témoins ne présentent qu'un faible développement ou sont entièrement clairs. En répartissant 0,1 cm<sup>3</sup> de culture de pneumocoque diluée à 1/10 dans le bouillon, on observe qu'après vingt-deux heures, seul le tube de bouillon contenant 1/2.000 de jaune d'œuf présente un net développement, alors que les 2 tubes témoins et le tube contenant 1/20.000 de jeune d'œuf restent stériles.

Des expériences analogues effectuées avec des cultures de colibacille et *Bacillus subtilis* diluées jusqu'à 1/10.000 n'ont pas donné de résultat très net. De même, nous n'avons observé aucune action du jaune d'œuf sur le développement du bacille tuberculeux en bouillon glycériné.

**CONCLUSIONS.** — Il semble résulter de ces expériences qu'il existe dans le jaune d'œuf des principes capables d'agir sur la vitesse de croissance de certains germes, tels que le staphylocoque, le pneumocoque et le streptocoque. Ces principes agissent à des dilutions très faibles, puisque en bouillon ordinaire la dilution de jaune d'œuf capable d'agir sur le développement de ces germes peut être évaluée à 1/2.000 à 1/20.000. Des recherches sont en cours en vue d'isoler ces principes.

(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

**SUR LA STABILISATION  
DU POUVOIR BACTÉRIOSTATIQUE DES SAVONS  
DES ACIDES GRAS DE L'HUILE DE FOIE DE MORUE  
ET SUR LEUR MODE D'ACTION**

par J. SOLOMIDÈS.

Nous avons déjà signalé que dans certaines conditions bien déterminées (pH élevé : 8,5 à 9, concentration à 1/10 dans l'eau ou dans l'alcool), les acides gras de l'huile de foie de morue sont doués vis-à-vis de certains germes, et en particulier du streptocoque et du pneumocoque, d'un pouvoir bactériostatique considérable arrêtant le développement de ces germes à des dilutions de 1/90.000.000 et 1/9.000.000.000 respectivement (1). Au cours de ces expériences nous avons été frappé, ainsi que nous l'avons déjà rapporté, par la variation considérable du pouvoir bactériostatique des solutions savonneuses des acides gras de l'huile de foie de morue, les solutions concentrées titrant plus fort que les mêmes solutions aquueuses diluées. De même, nous avons observé que le pouvoir bactériostatique de ces acides était nul dans l'eau peptonée alors qu'il était considérable en bouillon ordinaire. Afin d'éclaircir les questions posées par ces expériences, nous avons admis comme hypothèse de travail que les variations du pouvoir antibiotique constatées, étaient dues à l'hydrolyse des savons alcalins de ces acides gras, hydrolyse d'autant plus accentuée que leur dilution dans l'eau est plus grande. Comme suite logique de cette hypothèse et dans le but de supprimer ou de diminuer cette hydrolyse, nous avons essayé de réaliser la combinaison de ces acides gras, acides faibles, avec des bases organiques faibles, telles que l'aniline ou la pyridine.

En ce qui concerne la pyridine, nous introduisons 1 cm<sup>3</sup> de solution alcoolique à 1/10 d'acides gras dans 9 cm. de pyridine, ce qui fait une solution pyridinée à 1/100 d'acides gras. Nous chauffons légèrement jusqu'à 60° environ et nous faisons à partir de cette solution des dilutions dans l'eau distillée de plus en plus faibles (à 1/1.000 et 1/10.000 en général). On fait par la suite le titrage de chacune de ces solutions, d'une part, en eau peptonée et, d'autre part, en bouillon ordinaire. On observe ainsi que le titre de ces solutions vis-à-vis du streptocoque, le germe choisi pour ces expériences, est dans tous les cas le même et peut être évalué à 1/600.000 environ. Bien entendu, nous nous sommes assuré que le pouvoir antistreptococcique très faible de la pyridine (1/200 à 1/300) ne peut être tenu pour responsable des résultats obtenus.

Quant à l'aniline, nous chauffons légèrement 0,2 cm<sup>3</sup> d'aniline avec 1 cm<sup>3</sup> de solution alcoolique à 1/100 d'acides gras, puis nous y ajoutons 8,8 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. On a ainsi une solution à 1/1.000 d'acides gras à partir de laquelle on peut réaliser des solutions aquueuses de plus en plus faibles (à 1/10.000 par exemple) dont on titre l'activité antistrep-

(1) J. SOLOMIDÈS et A. HIRSCH, ces *Annales*, 1947, 73, 904.

tococcique en bouillon ordinaire et en eau peptonée. Comme dans le cas précédent, on trouve ainsi que quelle que soit la teneur en acides gras de la solution titrée, son pouvoir bactériostatique est toujours le même et de l'ordre de 1/1.000.000. Des titrages des solutions alcoolo-aqueuses d'aniline nous ont montré que cette substance n'est douée que d'un trop faible pouvoir antibiotique (de l'ordre de 1/2.000 à 1/2.500) pour pouvoir rendre compte de ces résultats.

Dans un autre ordre d'idées, nous nous sommes demandé si les doubles ou triples liaisons de certains des acides gras de l'huile de foie de morue n'étaient pas responsables de la grande activité antibactérienne de ces corps et nous avons été amené à saturer ces acides gras, d'une part, par l'hydrogène et, d'autre part, par l'iode. Nous avons ainsi observé que dans le premier cas (hydrogénéation) le pouvoir antibiotique de ces corps titré suivant les conditions optima indiquées plus haut (solution alcoolique à 1/10 de pH élevé), tombe pratiquement à zéro et que dans le deuxième cas, il reste à peu près intact.

D'autre part, étant donné l'action bien connue de certains acides gras sur la tension superficielle du milieu et l'action opposante du sérum sanguin vis-à-vis des corps tensio-actifs, nous avons filtré le pouvoir bactériostatique de ces acides en présence de sérum de cheval. On observe, dans ces conditions, que tandis qu'en bouillon ordinaire sans sérum, le streptocoque ou le pneumocoque sont inhibés à des dilutions considérables (1/90.000.000 et 1/9.000.000.000), en bouillon ordinaire contenant 1/10 ou 1/20 de sérum, ces mêmes germes se développent même à des dilutions relativement faibles (1/9.000). De même, l'action inhibitrice qu'en bouillon glycériné ces acides exercent sur le développement du Bacille tuberculeux (2), disparaît en présence de sérum à 1/10 ou à 1/20. Par ailleurs, l'action thérapeutique de ces corps sur des souris inoculées avec le pneumocoque s'est montrée pratiquement nulle.

De même que le sérum, des quantités très faibles de milieu de Besredka introduites dans le bouillon ordinaire à raison de 0,1 cm<sup>3</sup> pour 9 cm<sup>3</sup> de bouillon, se sont montrées capables de neutraliser entièrement toute activité antibactérienne des acides gras de l'huile de foie de morue.

**DISCUSSION.** — Nous avons vu qu'en traitant à chaud les acides gras de l'huile de foie de morue soit par la pyridine, soit par l'aniline, on arrive à stabiliser le pouvoir bactériostatique de ces corps, de sorte que n'importe laquelle de leurs dilutions dans l'eau, titrée en eau peptonée ou en bouillon ordinaire, présente le même pouvoir bactériostatique, ce qui n'est pas le cas pour les savons alcalins de ces mêmes acides. Il semble donc que l'aniline ou la pyridine forment avec ces acides gras des savons plus stables, moins hydrolysables en solution aqueuse que les savons alcalins de ces acides. C'est, d'ailleurs, l'hydrolyse de ces savons alcalins qui, à notre avis, peut rendre compte du fait que ces corps sont extrêmement actifs en bouillon ordinaire, alors qu'ils ont un pouvoir bactériostatique nul en eau peptonée. En effet, il est raisonnable d'admettre que l'hydrolyse des savons alcalins en bouillon ordinaire aboutit à une combinaison entre les acides gras libérés par elle et une base organique se trouvant dans le bouillon, base analogue à la pyri-

(2) J. SOLOMIDÈS et A. HIRSCH, *Rev. Tub.*, 1947, **11**, 599.

dine ou l'aniline. On comprend dès lors qu'en eau peptonée ou en milieu de Sauton pour le Bacille tuberculeux (2), milieux d'origine différente et ne contenant très vraisemblablement pas ce principe, l'hydrolyse des savons alcalins aboutisse à la libération et à l'insolubilisation des acides gras avec comme conséquence une perte complète de leur pouvoir antibactérien.

Nous avons aussi montré que l'hydrogénéation fait perdre aux acides gras de l'huile de foie de morue leur pouvoir bactériostatique alors que leur saturation par l'iode le laisse intact. Ces faits montrent que les acides gras non saturés sont bien responsables du pouvoir antibiotique des acides gras de l'huile de foie de morue, mais que l'existence de doubles ou triples liaisons n'est nullement nécessaire pour que ce pouvoir se manifeste, puisque leur saturation par l'iode n'affecte pas ce pouvoir. A notre avis, l'hydrogénéation fait perdre aux acides gras non saturés leur pouvoir antibactérien en augmentant leur point de fusion et en diminuant, de ce fait, leur solubilité. On sait, en effet, que l'hydrogénéation des acides gras non saturés augmente leur point de fusion et que, d'après A. Hirsch (3) le pouvoir bactériostatique des acides gras augmente avec leur indice d'iode.

Enfin, l'inhibition de l'action antibactérienne des acides gras de l'huile de foie de morue par le sérum pourrait signifier que ces substances agissent sur les microbes par simple diminution de la tension superficielle du milieu de culture dans lequel elles se trouvent. Or, s'il en était ainsi, d'autres substances tensio-actives, telles que la lécithine et le milieu de Besredka qui en contient, devraient pouvoir renforcer l'action bactériostatique des acides gras de l'huile de foie de morue en diminuant encore davantage la tension superficielle du milieu. Or, nous avons montré qu'il n'en est rien pour le milieu de Besredka et des expériences récentes dues à Alexander et Soltys (4) montrent qu'on peut raisonnablement considérer les modifications de la tension superficielle du milieu contenant des substances tensio-actives antibiotiques comme la conséquence plutôt que comme la cause même de leur action antibactérienne. En effet, ces auteurs en mesurant la tension superficielle des milieux de culture ensemencés avec des microbes acido-résistants et contenant diverses substances tensio-actives, dont l'acide oléique qui fait partie des acides gras de l'huile de foie de morue, trouvent que la tension superficielle de ces milieux varie avec le temps et que, faible au début, elle s'élève par la suite, ce qui montrerait d'après ces auteurs, que la substance antibiotique et tensio-active est adsorbée à la surface des bactéries. D'après ces mêmes auteurs, la diminution de la tension superficielle par les substances tensio-actives favoriserait leur propre adsorption par les microbes et l'action inhibitrice de la gélose contre l'action antimicrobienne de ces substances pourrait être due à une combinaison de ces corps tensio-actifs, non plus avec les microbes, mais avec la gélose. A la lumière de ces travaux, on peut raisonnablement conclure que les acides gras de l'huile de foie de morue sont adsorbés par les microbes sensibles dont ils inhibent la croissance, mais que cette adsorption n'a pas lieu en présence de grosses molécules colloïdales (protéines sériques, phospholipides), l'adsorption se faisant, dans ce

(3) A. HIRSCH, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 222.

(4) ALEXANDER et SOLTYS, *J. Path. Bact.*, 1946, **58**, 37.

dernier cas, entre acides gras et molécules colloïdales. Par ailleurs, Dubos (5) a mis à profit cet effet protecteur des protéines sériques contre les effets toxiques des acides gras et en particulier du Tween 80, pour constituer un milieu de culture dans lequel le Bacille tuberculeux pousse en profondeur.

**CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ.** — 1<sup>o</sup> A l'opposé de ce qui se passe avec les savons alcalins des acides gras de l'huile de foie de morue, la combinaison de ces acides avec certaines bases organiques faibles, telles que l'aniline et la pyridine, donne des savons dont le pouvoir bactériostatique, quelle que soit leur dilution dans l'eau, reste remarquablement le même, aussi bien en bouillon ordinaire qu'en eau peptonée. La non hydrolyse de ces savons de l'aniline et de la pyridine pourrait rendre compte de ces faits.

2<sup>o</sup> La saturation des acides gras de l'huile de foie de morue par l'hydrogène semble supprimer le pouvoir antibiotique de ces corps, alors que leur saturation par l'iode le laisse intact. Les acides gras non saturés seraient donc responsables de l'action antibactérienne des acides gras de l'huile de foie de morue, sans que l'existence de double ou triple liaison sur leur molécule soit nécessaire à leur activité antibactérienne.

3<sup>o</sup> Certaines substances, telles que le sérum et le jaune d'œuf contenu dans le milieu de Besredka, inhibent l'effet antibiotique des acides gras de l'huile de foie de morue et semblent protéger les microbes sensibles par adsorption des acides gras.

4<sup>o</sup> L'effet protecteur du sérum sanguin s'exerce très vraisemblablement *in vivo* aussi chez la souris inoculée avec du pneumocoque. En effet, chez cet animal le traitement par les savons des acides gras de l'huile de foie de morue s'est montré tout à fait inefficace.

(*Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.*)

## ACTION ANTI-PÉNICILLINE DU NUCLÉINATE DE SOUDE ET COMPARAISON DE SA VITESSE D'ACTION AVEC CELLES DES ANTI-SULFAMIDES ET ANTI-PÉNICILLINES CONNUS

par MICHEL FAGUET.

Certains auteurs (1) ont signalé que l'acide nucléique, constituant essentiel de la cellule bactérienne, inhibe l'action antibiotique de la pénicilline. En 1941, on avait montré l'antagonisme de l'acide nucléique à l'égard des dérivés de l'acridine (2).

(5) R. DUBOS et B. DAVIS, *J. exp. Med.*, 1946, 83, 409.

(1) K. M. PANDALAI et M. GEORGE, *Brit. med. J.*, 9 août 1947, 210. Ces auteurs n'indiquent pas la nature de l'acide nucléique dont ils se sont servis.

(2) H. MC ILWAIN, *Biochem. J.*, 1941, 35, 1311.

Nous avons repris cette étude en utilisant le nucléinate de soude extrait de levure (Merck) et nous avons comparé la vitesse d'action de ce composé aux vitesses de neutralisation des sulfamides par l'acide p.amino-benzoïque et de la pénicilline par la pénicillinase.

Nous avons utilisé plusieurs souches de *Staph. aureus* [souches Londres, Cheftel et 133 (3)]. Ces souches ont été cultivées, soit en bouillon de viande glucosé à 0,5 p. 100 ou non glucosé, soit en eau peptonée à 3 p. 100, glucosée à 0,5 p. 100 ou non glucosée — et ces mêmes milieux de culture ont été utilisés dans ces expériences. Elles ont été faites, soit dans des séries de tubes à essais de 16 mm. de diamètre, soit, lorsqu'elles étaient étudiées au microbiophotomètre enregistreur (4), dans des cuves à faces parallèles de 50 cm<sup>3</sup> de capacité.

Le tableau I montre qu'en eau peptonée glucosée le nucléinate de

TABLEAU I. — Activité antipénicilline du nucléinate de soude de levure (Merck) sur *Staph. aureus* (souche Cheftel), cultivé sur eau peptonée glucosée 0,5 p. 100 (culture de vingt-quatre heures).

NUMÉRO d'ordre	MILIEU DE CULTURE	PRODUITS AJOUTÉS	CROISSANCE (1)
1 . . .	Eau pept. gluc. 0,5 p. 100.	0,17 U.P./cm <sup>3</sup> (2).	++++
2 . . .	"	0,17 U.P./cm <sup>3</sup> + 1 p. 1.000.	— — —
3 . . .	"	0,17 U.P./cm <sup>3</sup> + 1 p. 500.	++
4 . . .	"	0,20 U.P./cm <sup>3</sup> .	— — —
5 . . .	"	0,20 U.P./cm <sup>3</sup> + 1 p. 500.	++
6 . . .	"	0,20 U.P./cm <sup>3</sup> + 1 p. 500.	++

(1) Examinée après quarante-huit heures.

(2) U.P. = unités Oxford de pénicilline.

TABLEAU II. — Même expérience que celle décrite dans le tableau I *Staph. aureus* (souche Cheftel) en bouillon glucosé.

NUMÉRO d'ordre	MILIEU (10 cm <sup>3</sup> )	PRODUITS AJOUTÉS au moment de l'ensemencement	CROISSANCE observée après 48 heures
1 . . . . .	Bouillon non glucosé.		++++
2 . . . . .	"	0,17 U.P./cm <sup>3</sup> .	— — —
3 . . . . .	"	0,17 U.P./cm <sup>3</sup> + 1 p. 2.000.	— —
4 . . . . .	"	0,17 U.P./cm <sup>3</sup> + 1 p. 1.000.	— —
5 . . . . .	"	0,17 U.P./cm <sup>3</sup> + 1 p. 750.	— —
6 . . . . .	"	0,17 U.P./cm <sup>3</sup> + 1 p. 500.	— —
7 . . . . .	"	0,17 U.P./cm <sup>3</sup> + 1 p. 100.	— —

(3) Ces souches nous ont été obligamment données par M. F. Boyer, du Laboratoire de bactériologie du Service de Chimie thérapeutique.

(4) M. FAGUET, *Act. Sc. Ind.*, 1941, n° 898, 102 (Hermann, édit., Paris). — M. FAGUET et F. NITTI, *Ces Annales*, 1943, 69, 126. — M. FAGUET, *J. Suisse de Médec.*, 1936, 44, 1135.

soude, à la dose de 1 p. 1.000, neutralise l'action antistaphylococcique (souche Cheftel) de 0,17 unité Oxford de pénicilline par centimètre cube de milieu. Dans plusieurs séries d'expériences, nous avons noté une activité très inférieure du nucléinate de soude et dans certaines séries de cultures sur bouillon non glucosé la reprise de la culture a été nulle ou insignifiante.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons enregistré au moyen de notre microbiophotomètre enregistreur les courbes de croissance des mélanges antagonistes : pénicilline-nucléinate de sodium, pénicilline-pénicillinase et sulfamide-acide *p*.amino-benzoïque, et nous avons comparé les différentes phases du développement des cultures ainsi que leurs taux de croissance.

Les expériences que nous avons réalisées peuvent être résumées dans les 3 groupes de courbes suivantes :

PREMIER GROUPE (fig. 1). — *Cuve 1* : Culture *staphylocoque* témoin

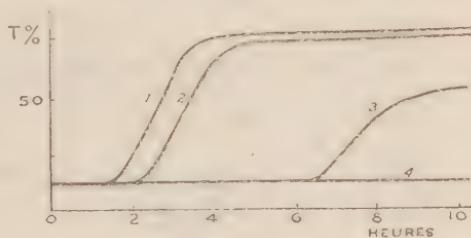


FIG. 1.

(souche 133). Milieu : eau peptonée à 3 p. 100 et glucosée à 0,5 p. 100 ; pH = 7,6. Ensemencement : 5 =  $10^6$  germes par centimètre cube, provenant d'une culture de vingt-quatre heures en eau peptonée glucosée.

*Cuve 2* : Culture *staphylocoque* (mêmes conditions de culture que celles de la cuve 1) + 3 cm<sup>3</sup> pénicillinase Ungar + 10 Unités Oxford pénicilline.

*Cuve 3* : Culture *staphylocoque* (mêmes conditions de culture que les 2 premières) + 10 Unités Oxford pénicilline + nucléinate de sodium (1 p. 2.000).

L'examen des courbes de croissance correspondantes, 1, 2, 3 nous montre que la pénicillinase ajoutée au moment de l'ensemencement ne neutralise pas instantanément l'effet de la pénicilline ; même en opérant avec un grand excès de pénicillinase le temps de latence reste augmenté de une à deux heures environ. Nous constatons également un plus grand allongement de la phase de latence pour le mélange pénicilline-nucléinate de sodium. Nous pouvons remarquer d'autre part que le taux de croissance pendant la phase logarithmique est le même dans la culture témoin et dans la culture pénicilline + pénicillinase, alors qu'il est diminué dans la culture pénicilline + nucléinate de sodium.

DEUXIÈME GROUPE (fig. 2). — Dans cette série, trois des cuves sur les six du microbiophotomètre enregistreur ont été utilisées (milieu de

culture = eau peptonée à 3 p. 100 et glucosée à 0,5 p. 100 — pH = 7,6.

Cuve 1 : Culture témoin de *Staph. aureus* (133).

Cuves 2 et 3 : Cultures staphylocoque en présence de 0,2 U. P. par 50 cm<sup>3</sup>.

A l'instant B, addition de 1 cm<sup>3</sup> de pénicillinase à la cuve 2.

L'étude de ces courbes montre que l'addition de pénicillinase à une culture contenant une faible quantité de pénicilline permettant encore une légère croissance, provoque une reprise de la culture. Il existe une légère phase de latence avant la phase logarithmique de la nouvelle croissance dont le taux n'atteint pas celui de la culture témoin (5).

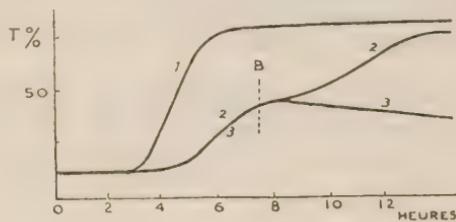


FIG. 2.

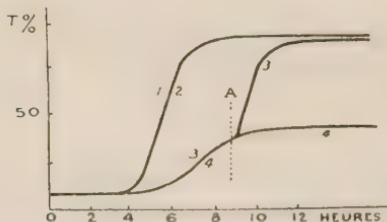


FIG. 3.

TROISIÈME GROUPE (fig. 3). — Cuve 1 : Culture témoin *E. coli* (souche Monod) en milieu synthétique pH = 7,4.

Cuve 2 : Culture *E. coli* + *p.aminophénylsulfamide* (1162 F.) + *p.aminobenzoate de soude* (ajoutés au moment de l'ensemencement).

Cuves 3 et 4 : Culture *E. coli* + *p.aminophénylsulfamide* (au moment de l'ensemencement).

A l'instant A, addition d'un excès de *p.aminobenzoate de sodium* à la cuve 3.

L'examen de ces courbes montre que l'addition d'un excès d'acide paraaminobenzoïque à une culture inhibée par le 1162 F détermine une reprise immédiate (6) de la culture avec un taux de croissance égal à celui de la culture témoin.

La comparaison de ces différentes courbes nous montre des différences

(5) M. FAGUET et P. NICOLLE, ces Annales, 1947, 73, 1150.

(6) F. NITTI et M. FAGUET, Ces Annales, 1944, 70, 124.

importantes dans les vitesses d'action de plusieurs antagonistes de l'activité bactériostatique des sulfamides et de la pénicilline.

Alors que la reprise d'une culture de *E. coli* inhibée par le 1162 F est immédiate après addition d'acide para-aminobenzoïque avec taux de croissance égal à celui du témoin, celle d'une culture de *Staph. aureus* inhibée par la pénicilline et additionnée d'un excès de pénicillinase ne se produit qu'après une phase de latence de quelques heures (une à deux environ).

Le taux de croissance est alors égal à celui de la culture témoin.

Enfin, lorsque nous remplaçons la pénicillinase par le nucléinate de soude, la phase de latence est plus longue (quatre à huit heures) et le taux de croissance plus faible que dans la culture témoin.

D'après les théories récentes (7), celle de Woods et Fildes (8) suivant laquelle les sulfamides agiraient en interférant avec l'acide para-aminobenzoïque de la cellule bactérienne, n'étant plus considérée comme valable, les sulfamides inhiberaient certaines déshydrogénases et carboxylases et bloqueraient les réactions enzymatiques libérant l'énergie nécessaire à la croissance (9).

Les courbes enregistrées nous montrent que l'acide *p*.aminobenzoïque doit donc avoir une action immédiate sur ces enzymes.

Pour la pénicillinase et le nucléinate de soude, il n'en est pas de même. Il semblerait que nous assistions là à une adaptation plus lente. Le mécanisme d'action du nucléinate de sodium est encore obscur, puisque ce cas d'antagonisme ne semble pas pouvoir être relié, du moins directement, à l'activité antipénicilline du groupe sulphydryl, dont les recherches récentes (10) ont signalé l'importance dans l'inactivation de la pénicilline.

**RÉSUMÉ.** — Il résulte de ces quelques essais, que le nucléinate de sodium extrait de levure, montre bien une action antipénicilline pour *Staph. aureus*, cultivé en eau peptonée glucosée, mais que cette action est parfois faible.

De plus, la phase de latence des cultures (pénicilline-acide nucléique) est plus longue (six à huit heures) que celles des cultures pénicilline-pénicillinase (deux heures environ) et des cultures (*E. coli*) sulfamide-acide *p*.aminobenzoïque, où elle est nulle.

(Service du Bactériophage. Institut Pasteur.)

(7) D. D. Woods et P. FILDES, *Chem. a. Industr.*, 1940, **59**, 133.

(8) K. C. FISHER, R. J. HENRY et E. LOWE, *J. Pharmacol.*, 1944, **81**, 58. — G. R. GOETCHIUS et C. H. LAWRENCE, *J. Bact.*, 1945, **49**, 575.

(9) M. G. SEVAG et M. SHELBOURNE, *J. Bact.*, 1942, **43**, 447.

(10) C. J. CAVALLITO, J. BAILEY, I. HASKEL, J. MC CORNUCK et W. F. WARNER, *J. Bact.*, 1945, **50**, 61. — T. HANSCHKA, G. TOENNIES et A. P. SWAIN, *Science*, 1945, 383.

**A PROPOS DE L'ARTICLE DE F. TISON :  
NOUVEAU PROCÉDÉ D'INOCULATION AU COBAYE  
DES PRODUITS SUSPECTS DE TUBERCULOSE  
APRÈS MODIFICATION PAR CONTACT  
AVEC LA PÉNICILLINE CALCIQUE**

par P. HAUDUROY, G. BOUVIER et W. ROSSET.

Dans le n° 10 (octobre 1947) des *Annales de l'Institut Pasteur*, F. Tison a exposé un très intéressant procédé d'inoculation au cobaye de produits suspects de tuberculose traités par la pénicilline calcique.

Dans la première phrase de cette note, cet auteur écrit :

« Les résultats encourageants obtenus en inoculant les produits pathologiques non modifiés chez le cobaye traité par les sulfamides préventivement nous ont déterminé à rechercher si la pénicilline peut être utilisée dans un but analogue. »

Les références indiquées dans cette phrase sont les suivantes : F. Tison, *Soc. Fr. Microbiologie*, 4 juillet 1946 ; Hauduroy, Bouvier et Rosset, *Presse Médicale*, 16 novembre 1946, 770.

Nous désirerions rétablir l'ordre chronologique des publications faites sur ce sujet et rappeler en même temps que c'est nous qui, pour la première fois, avons institué la technique d'inoculation au cobaye de produits suspects de tuberculose non modifiés par les méthodes habituelles, les cobayes étant traités simultanément par les sulfamides pour éviter les infections dues aux germes associés.

Notre première publication sur ce sujet est intitulée : Hauduroy, Bouvier, Rosset : *Nouvelle technique de découverte de bacilles tuberculeux dans les produits pathologiques*.

Elle a fait l'objet d'une publication, le 25 juin 1944, à la Société Suisse de Microbiologie, et a paru dans le *Schweizerische Zeitschrift für Pathologie und Bakteriologie* 1944, 7, fasc. 4.

Une deuxième communication sur le même sujet a été faite par Hauduroy, Bouvier et Rosset à la Société de Biologie dans sa séance du 14 avril 1945, et a paru dans les *Comptes-rendus de la Société de Biologie*, 1945, 139, 354.

Tous ces travaux sont très antérieurs à notre publication du

16 novembre 1946 de *La Presse Médicale* et à celle de M. Tison à la *Société Française de Microbiologie* du 4 juillet 1946.

Nous pensons donc qu'il ne peut y avoir aucune discussion sur la priorité de ces travaux.

(*Institut de Bactériologie, d'Hygiène et de Parasitologie, Lausanne.*)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Sur le mécanisme de la réaction du choléra-roth**, par J. GALLUT.

**La pénicillinase. Conditions de production. Etude de l'activité**,  
par F. GRUMBACH, B. SUREAU et F. BOYER.

**Action de la streptomycine sur l'infection tuberculeuse en cultures de tissus**, par G. BARSKI.

---

### Séance du 4 décembre 1947.

Présidence de M. MAGROU.

---

### NÉCROLOGIE

#### ALBERT BERTHELOT

(1881-1947)

---

La Société française de Microbiologie et l'Institut Pasteur viennent d'éprouver une lourde perte, en la personne de l'un des plus anciens et des plus estimés travailleurs de la Maison, le Dr Berthelot, que son mauvais état de santé tenait malheureusement éloigné de nos séances depuis quelque temps. Né à Paris en 1881, Albert Berthelot était fils d'un officier qui avait combattu en 1870 et qui mourut prématurément, à l'âge de quarante-deux ans, à Marseille où, après avoir quitté l'armée, il occupait un emploi civil. Le jeune Berthelot revint habiter Paris avec sa mère qui, privée de ressources, se mit courageusement à travailler pour gagner sa vie et celle de son fils, à qui elle avait le souci de donner une éducation soignée. Elle le fit admettre, à l'âge

de onze ans, dans une école primaire supérieure dirigée par les Frères des Ecoles chrétiennes, où il devait rester plus de cinq ans. C'est là qu'il commença à manifester son goût pour la science, en fréquentant, pendant les récréations, le laboratoire de physique, chimie et histoire naturelle d'un vieux Frère, chargé de l'enseignement de ces disciplines. A sa sortie de l'Ecole, à l'âge de dix-sept ans, il entra dans le laboratoire du chimiste Aimé Girard, professeur au Conservatoire des Arts et Métiers et à l'Institut Agronomique ; il n'y resta que peu de temps, Aimé Girard étant mort presque aussitôt. Après un court passage dans un laboratoire d'œnologie, où il s'initia, tout seul, à la Bactériologie, il fut admis comme auditeur libre à l'Institut Agronomique, dont il suivit les cours pendant quatre ans. En 1901, il devint préparateur de Georges Lemoine, professeur de Chimie à l'Ecole Polytechnique ; il devait y rester jusqu'en 1903.

Berthelot avait le plus grand désir d'entrer à l'Institut Pasteur, où il avait déjà fait un court séjour, vers 1902, dans le laboratoire de Chhimie appliquée à l'Hygiène, dirigé par Trillat. Lemoine le recommanda à M. Roux, qui, en 1904, le chargea de chercher un milieu de culture économique pour le virus de Danysz, destiné à la destruction des campagnols. Ayant réussi dans cette tâche, il prit place à titre définitif dans le personnel scientifique de l'Institut Pasteur. Soucieux tout d'abord de compléter ses connaissances, il prépara et passa la licence ès sciences, puis fit ses études de médecine (il devait prendre le grade de docteur en médecine en 1913, avec une thèse sur les propriétés biochimiques de différentes variétés de *Proteus vulgaris*.)

Au moment où Berthelot entrait à l'Institut Pasteur, Metchnikoff était plongé dans ses recherches sur la flore intestinale. Ayant besoin d'un chimiste pour étudier les questions relatives à l'auto-intoxication intestinale, il s'adressa à Berthelot. Metchnikoff cherchait en vain, parmi les bactéries de la flore intestinale, des espèces productrices de quantités notables de poisons sclérosants, de phénols, en particulier. Enensemencant un milieu à base de tyrosine avec des traces de matières fécales, Berthelot réussit à isoler un germe qu'il nomma *Bacillus phenologenes*, qui produisait du phénol en abondance. Il en étudia en détail toutes les propriétés, et en 1918, il publia sur ce sujet, dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, un mémoire qui fut reproduit dans le livre jubilaire de Metchnikoff.

Ce succès attira l'attention sur Berthelot, et sa collaboration fut recherchée par la plupart des bactériologistes de l'Institut Pasteur qui avaient à résoudre des problèmes biochimiques. Parmi ses collaborateurs, citons Maurice Nicolle (propriétés antivenimeuses de certains esters de la tyrosine) ; A.-R. Prévot (influence du pyruvate de sodium sur la production de toxine par le *B. oedematiens*) ; M. Loiseau (influence du pyruvate de sodium sur la formation de la toxine téta-nique) ; A. Séguin (culture des spirochètes dans les milieux additionnés de pyruvate de sodium) ; G. Ramon (sur les agents de transformation des toxines en anatoxines et sur la production de toxine et d'anatoxine diptériques de valeur antigène élevée). Le professeur Calmette l'attacha, en qualité de chimiste, au Service de Recherches sur la Tuberculose, et Berthelot fit là d'importantes découvertes sur la biochimie du *B. tuberculeux*.

Indépendamment de ces recherches, Berthelot publia, seul ou avec son assistante, M<sup>me</sup> Amoureux, un grand nombre de notes relatives à des sujets variés. Le temps nous fait défaut pour entrer dans le détail de ces travaux ; nous nous bornerons à signaler ses recherches particulièrement originales et suggestives sur le *Bacterium tumefaciens* et le cancer des plantes.

S'inspirant des travaux de Gabriel Bertrand sur les infiniment petits chimiques ou oligo-éléments, Berthelot prépara, pour la culture soit des bactéries, soit des plantes aseptiques, des milieux synthétiques dans lesquels il introduisait une solution dite polymétallique ou oligodynamique, renfermant à l'état de traces des sels de divers métaux susceptibles d'agir comme oligo-éléments. (Ces milieux de Berthelot sont aujourd'hui d'un usage courant dans tous les laboratoires de Biologie végétale pour les cultures aseptiques de plantes ou pour les cultures de tissus végétaux.) Berthelot réussit ainsi à obtenir des tumeurs par inoculation de *Bact. tumefaciens* à des plantules et à de jeunes plantes cultivées aseptiquement. Avec M<sup>me</sup> Amoureux, il découvrit en outre, dans les cultures de *Bact. tumefaciens* sur milieux contenant du tryptophane, la présence d'acide indol- $\beta$ -acétique, hétéroauxine capable de stimuler la prolifération cellulaire. Berthelot et M<sup>me</sup> Amoureux obtinrent des proliférations néoplasiques chez des plantes traitées par l'acide indol- $\beta$ -acétique. D'où la conclusion que cet acide joue un rôle important dans la genèse des tumeurs que détermine le *Bact. tumefaciens*. On peut même se demander si une teneur exceptionnellement faible des sucs en tryptophane ne serait point, parmi d'autres, un des facteurs de l'immunité de certaines espèces végétales à l'égard de ce parasite.

Berthelot accomplit cette œuvre scientifique considérable en dépit d'une santé déficiente. Mobilisé au premier jour de la guerre de 1914 en qualité de médecin militaire, il contracta au front une dysenterie qui l'obligea à rentrer dans ses foyers et qui se compliqua de poly-névrite et de troubles digestifs. Dès lors, il fut contraint par son mauvais état de santé à garder souvent la chambre. Il profita de ces loisirs forcés pour multiplier ses lectures et acquérir ainsi une érudition prodigieuse, dont il faisait généreusement profiter ses collègues et amis.

Il y a deux ans, il fut terrassé par une attaque de paralysie qui l'éloigna définitivement de son laboratoire. Mais son activité intellectuelle était restée intacte, et de l'Hôpital Pasteur, ou de son modeste logis de la rue Jean-Daudin, il continuait à diriger les recherches qu'il inspirait à ses collaborateurs. Il succomba le 15 novembre à une affection pulmonaire.

Tous, nous nous inclinons avec émotion devant le chercheur ingénieux et inventif, devant le collègue affable et courtois, devant l'ami affectueux et dévoué qu'était Albert Berthelot.

J. MAGROU.

## COMMUNIQUÉS

A l'occasion du Centenaire de la Révolution nationale de 1848, il est organisé à Budapest une Grande Semaine Médicale, qui aura lieu du 4 au 12 septembre 1948. Vingt-deux sections médicales et chirurgicales traiteront leurs spécialités. Les médecins français sont invités à participer à ces Journées.

Pour tous renseignements, s'adresser au Secrétaire général du Syndicat libre des Médecins Hongrois, V, Nador Utca 32, Budapest (Hongrie).

---

Les 27 et 28 avril 1948 aura lieu à Paris, Salle des Congrès de la Chambre de Commerce de Paris, 2, place de la Bourse, Paris, le 1<sup>er</sup> Congrès International des Producteurs de Jus de Fruits, organisé par l'Union Nationale des Producteurs de Jus de Fruits de la Métropole et d'Outre-Mer. Cette manifestation permettra aux représentants de vingt nations d'examiner en commun les législations appliquées à ces produits, les méthodes de production et l'effort de propagande. Une Association Internationale aura pour mission d'examiner périodiquement l'évolution technique et scientifique de la production des jus de fruits.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*